

Schweizerisches Tropeninstitut, Basel, und
Zoologische Anstalt der Universität Basel

Analyse des Infektionsverlaufes von *Plasmodium gallinaceum* im Darms von *Aedes aegypti*

Inauguraldissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Harro Stohler

von Ziefen, BL



Basel 1957

VERLAG FÜR RECHT UND GESELLSCHAFT AG., BASEL

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag
der Herren Professoren R. Geigy und A. Portmann.

Basel, den 25. 6. 1957.

Dekan

W. Becker.

**Analyse des Infektionsverlaufes von Plasmodium
gallinaceum im Darne von Aedes aegypti.**

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung	303
1. Fragestellung	303
2. Material	304
II. Morphologie und Histologie des Darmes von <i>Aedes aegypti</i> unter besonderer Berücksichtigung der Bildung und Beschaffenheit der peritrophischen Membran	304
1. Darmtrakt	304
2. Peritrophische Membran	305
a) Allgemein	305
b) Peritrophische Membran bei <i>Aedes aegypti</i>	308
Zeitlicher Ablauf der Bildung auf Grund von Autopsien	311
Submikroskopische Struktur	315
3. Diskussion der Resultate	316
III. Untersuchungen über die Lage der Oocysten auf dem Mitteldarm	318
1. Versuche und Resultate von SHUTE mit Anophelen und menschlichen Plasmodien	318
2. Eigene Versuche mit <i>Aedes aegypti</i> und <i>Plasmodium gallinaceum</i>	
a) Technik	319
b) Cystenverteilung bei normalem Infektionsverlauf	321
c) Cystenverteilung bei Mücken nach Haltung in Zwangslage	322
d) Infektionsgrad und Cystenzahl	324
3. Diskussion der Resultate	325
IV. Studium des Penetrationsvorganges der Ookineten	328
1. Bildungszeit und Anwesenheit der Ookineten im Mückendarm	328
2. Auszählung der Ookineten auf Schnitten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der infektiösen Blutmahlzeit	329
3. Zeitlicher Ablauf der Ookinetenwanderung vom Lumen bis auf die Darmaußenseite	332
4. Diskussion der Resultate	333
V. Zusammenhänge zwischen Infektionsverlauf und Beschaffenheit der peritrophischen Membran	340
VI. Kernvorgänge bei der Cystenentwicklung	342
VII. Literatur	347
VIII. Zusammenfassung	350

I. Einleitung.

1. Fragestellung.

Immer wieder wird bei der Sektion von Anophelen, die mit menschlichen Plasmodien infiziert sind, die Beobachtung gemacht, daß der hintere Teil des «Magens» in auffälliger Weise stärker mit Oocysten besetzt ist als der vordere. HUFF (1934) und SHUTE (1938) gingen der Frage nach und kamen zum Schlusse, daß diese unterschiedliche Verteilung zurückzuführen ist auf den Umstand, daß das aufgenommene Blut im Darm coaguliert und sich in Serum und Erythrocyten scheidet. Bei der normalen Ruhestellung nach dem Saugakt (senkrecht, Kopf aufwärts an der Wand) sinken die verklumpten Erythrocyten und damit auch die Gametocyten ab und sammeln sich im hintern Mitteldarmteil. Die entstehenden Ookineten dringen auf dem kürzesten Wege, d. h. ebenfalls im hintern Abschnitt, in die Darmwand ein und wachsen zu Oocysten heran. Diese Erklärung ist sehr einleuchtend, doch wurde dabei nicht berücksichtigt, daß die meisten Insekten, so auch Anophelen und Culiciden, eine peritrophische Membran (PM) besitzen. Diese umschließt nach dem Saugen das aufgenommene Blut. Die Frage drängt sich nun auf, ob und in welcher Weise die PM den Weg der Ookineten vom Darmlumen bis in die Darmwand beeinflussen kann. Daß diesem Punkt besondere Bedeutung zukommt, beweisen Beobachtungen bei andern Überträgern, wo sich die Krankheitserreger auch in irgendeiner Weise mit dem durch die PM gegebenen Hindernis auseinandersetzen müssen. Hier sei nur an die Verhältnisse bei der Trypanosomen-Übertragung durch die Tsetse-Fliegen (HOARE 1931), der Leishmania-Infektion von Phlebotomen (FENG 1951) und der Wanderung der Onchocerca-Wurmlarven in Simulium (LEWIS 1953) erinnert. Für Details sei auf die betreffenden Beschreibungen in GEIGY & HERBIG (1955) verwiesen. Ferner lassen Beobachtungen an virusübertragenden *Aedes aegypti* (HURLBUT 1951 und MCLEAN 1953 + 1955) die Vermutung zu, daß die PM sogar für Viren ein Hindernis darstellt.

Solche Fälle, bei denen die «Barrierefunktion» der PM erkannt worden ist, gaben Anlaß zu entsprechenden Untersuchungen über die Plasmodieninfektion bei Stechmücken. Unsere Fragen lassen sich also folgendermaßen formulieren:

Wie wird die PM gebildet? Stellt sie der Wanderung der Ookineten vom Lumen in die Darmwand ein Hindernis entgegen, d. h., ist die Membran durchlässig oder wird sie umgangen? Eingeschlossen in dieses Problem ist auch der zeitliche Ablauf der Ookineten- und Cystenbildung, die Art des Durchtrittes der Ookineten durch die Darmwand, sowie die Beobachtung der ersten Phase der Kernteilungen in der jungen Cyste.

Für unsere Versuche wurden *Plasmodium gallinaceum* und *Aedes aegypti* verwendet, obwohl SHUTE festgestellt hatte, daß bei dieser Mückenart die einseitige Cystenverteilung nicht in demselben Maße auftritt wie bei Anophelen. Verschiedene Gründe bewogen dazu. Erstens stand in Basel keine menschliche Malaria zur Verfügung. Zweitens kann die Prüfung der Frage, ob die PM für Ookineten durchlässig sei, ebenso gut an *Aedes* gemacht werden, und zudem bestand die Möglichkeit, nachzuprüfen, ob die Scheidung in Serum und Erythrocyten, wie sie von SHUTE bei *Anopheles maculipennis* festgestellt wurde, tatsächlich das verantwortliche Agens sei für die Konzentration der Cysten auf dem hintern Darmabschnitt. Im weitem konnten die etwas anders gearteten Verhältnisse bei *Aedes*, die von SHUTE nur gestreift wurden, weiter abgeklärt werden.

Diese Arbeit entstand im Schweizerischen Tropeninstitut in Basel auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. R. Geigy, und ich möchte nicht verfehlen, an dieser Stelle meinem geehrten Lehrer meinen besten Dank auszusprechen für die stete Hilfsbereitschaft, die umsichtige Beratung sowie auch für

die Erlaubnis, die Klimaräume und alle übrigen Einrichtungen und Materialquellen des Institutes benützen zu dürfen.

Ferner bin ich Herrn Dr. W. Huber, Bern, für die wertvolle Unterstützung bei der elektronenoptischen Untersuchung der peritrophischen Membran und nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Braut Hedy Frey zu herzlichem Dank verpflichtet.

2. Material.

Die in dieser Arbeit verwendeten *Aedes aegypti* L. stammen aus Leopoldville (Belgisch-Kongo) und werden seit 1945 am Tropeninstitut mit Erfolg gehalten. Über die Zuchtmethoden finden sich bei GANDER (1951) und GEIGY & HERBIG (1955, S. 119) ausführliche Angaben.

Plasmodium gallinaceum Brumpt wird seit 1948 am Tropeninstitut auf *Gallus gallus* L. (weiße Leghornrasse) gehalten, und zwar in regelmäßigem Turnus auch in zyklischen Passagen über die Mücke, um Degenerationserscheinungen zu vermeiden. Bei FREYVOGEL (1956) werden diese Fragen eingehend behandelt.

Auf die für die verschiedenen Untersuchungen angewandte Technik wird in den einzelnen Kapiteln eingegangen.

II. Morphologie und Histologie des Darmes von *Aedes aegypti* unter besonderer Berücksichtigung der Bildung und Beschaffenheit der peritrophischen Membran.

1. Darmtrakt.

Das Verdauungssystem von Culiciden ist schon oft beschrieben worden (siehe z. B. GEIGY & HERBIG 1955 S. 26 ff.), so daß wir uns hier darauf beschränken können, eine kurze Übersicht zu geben, die zum Verständnis der folgenden Ausführungen notwendig ist.

Der Darmkanal der weiblichen *Aedes aegypti* besteht aus einem einfachen, gestreckten Rohr und zerfällt in Vorder-, Mittel- und Enddarm.

Der Vorderdarm funktioniert im Kopfgebiet als Saugpumpe. Im Thorax bildet der Oesophagus eine im Gegensatz zum larvalen Zustand schwach ausgebildete Invagination (Valvula cardiaca) und ist kombiniert mit dem Cardiacalsphincter, der den Zugang zum Mitteldarm verschließen kann. Unmittelbar vor dieser Valvula zweigen dorsal zwei kleine Blindsäcke ab, während sich ventral der Oesophagus zu einem großen, dünnwandigen Divertikel ausbuchtet, das bis weit in das Abdomen hineinreicht. Diese oesophagalen Blindsäcke sind meist mit Luftblasen gefüllt. Der unpaare dient ausschließlich zur Aufnahme von Wasser und Zuckersäften, welche die einzige Nahrung der Männchen bildet und auch von den Weibchen neben Blut aufgenommen werden.

Der Mitteldarm beginnt an der Valvula cardiaca, endet an der Einmündungsstelle der fünf Malpighischen Gefäße und zerfällt in zwei Abschnitte. Der den Thorax durchziehende, enge Teil des

Mitteldarmes dient nicht zur Speicherung, diese beschränkt sich auf den abdominalen Abschnitt desselben. Dieser hintere erweiterte Abschnitt, oft auch Magen genannt, zeigt eine beachtliche Dehnbarkeit und nimmt im gefüllten Zustand eine ovoide Form an. Am Übergang zum Enddarm liegt der Pylorussphincter. Wenn dieser geschlossen ist, gelangen nur die Ausscheidungsprodukte der hinter diesem Sphincter einmündenden Malpighischen Gefäße in den Enddarm, der dann über das Rectum im After ausmündet.

Während Vorder- und Enddarm von einer chitinösen Intima ausgekleidet sind, fehlt diese im Mitteldarm. An ihre Stelle tritt die peritrophische Membran, über deren Bildung noch eingehend zu berichten ist.

Histologisch gesehen, besteht der Magen aus einer einfachen Lage von Epithelzellen, die auf einer äußerst feinen Basalmembran ruht. Er ist von innern, circulären und äußern, in Längsrichtung verlaufenden Muskelfasern, die rechtwinklig übereinander liegen, umschlossen. Der Mitteldarm, und im besonderen Maße der Magen, ist reichlich mit Tracheen versorgt.

Je nach Funktionszustand erscheinen die Zellen des Magens verschieden. Im leeren Darm ist das Epithel gefaltet und setzt sich aus säulenförmigen bis kubischen Zellen zusammen. Bei eintretender Füllung dehnt es sich, wobei sich die Falten glätten und die Zellen stark abflachen (vgl. Abb. 4 A). Der ovale bis runde, große Kern der Epithelzellen, dessen Chromatinsubstanz peripher angeordnet ist, enthält einen großen Nucleolus und liegt meist in der dem Darmlumen zugekehrten Hälfte. Das Plasma wird von färbbarer Granula durchsetzt, welche oft in Längsstreifen angeordnet sind. Die abgeflachten verdauenden Zellen weisen zwischen der Granula Vacuolen auf. Gegen das Lumen ist das Epithel vom Stäbchensaum begrenzt, der den ganzen Innenraum des Mitteldarmes auskleidet.

Über den ganzen Mitteldarm verteilt finden wir Regenerationszellen, die unter der Basalmembran liegen und sich mit fortschreitender Differenzierung als Ersatz zwischen die vollausgebildeten Zellen zwängen.

2. Peritrophische Membran.

a) Allgemein.

Die Epithelzellen des Mitteldarmes sind entodermalen Ursprunges und, im Gegensatz zu Vorder- und Enddarm, nicht mit einer Intima ausgekleidet. Bei vielen Insekten sind aber die im Darm enthaltenen Nahrungspartikel nicht in direkter Berührung mit

dem Epithel, sondern sie werden umschlossen von einer einfachen oder mehrschichtigen Lamelle, der peritrophischen Membran. Es wird oft behauptet, daß die PM die Mitteldarmzellen vor Beschädigung und Abscheuerung durch harte oder scharfe Nahrungsteile schützt, was allerdings für blut- und nektarsaugende Insekten nicht zutreffen kann. Ferner lassen verschiedene Experimente vermuten, daß die Membran bis zu einem gewissen Grade als Ultrafilter wirkt, mit einer Porengröße, die von Insekt zu Insekt variiert. Für die Verdauung jedoch ist sie kein Hindernis, da sie für die Verdauungsenzyme und ihre Produkte in beiden Richtungen durchlässig sein muß.

Nachdem die chitinöse Natur der PM eine langdiskutierte Streitfrage war und in der älteren Literatur abgelehnt wird, gilt sie heute als erwiesen. Ein positiver Chitintest im Mitteldarminhalt gilt sogar als Beweis für das Vorhandensein einer PM. Der Nachweis des Chitins erfolgt nach RICHARDS (1951) durch die Chitosan-Jod-Probe nach VAN WISELINGH, wobei allerdings ein negatives Ergebnis die Anwesenheit sehr kleiner Chitinmengen nicht ausschließt. Eingelagert in die chitinöse Substanz und mit einem eben solchen Film überzogen, finden sich Proteine, die bei der elektronenoptischen Untersuchung mit Verdauungsfermenten aufgelöst werden müssen, um die fibröse Chitinstruktur sichtbar zu machen.

Zahlreich sind die Arbeiten über die PM bei Insekten und widersprechend die Angaben über ihr Vorhandensein und ihre Entstehung. Die anfängliche Verwirrung entstand daraus, daß ein einheitlicher Bildungsmechanismus erwartet und gesucht wurde. Es hat sich dann aber herausgestellt, daß dem nicht so ist. Heute gibt es zwei anerkannte Entstehungstypen. Auf einen dritten, der von den beiden anderen in verschiedener Hinsicht abweicht, sind wir durch die vorliegenden Untersuchungen geführt worden. Ihm wird übrigens außer dem Bildungsmodus bei *Aedes* auch derjenige bei *Anophelen* und *Simulium* zugeordnet werden können, soweit dies aus Literaturangaben anderer Autoren geschlossen werden kann.

Zunächst sollen die beiden bereits anerkannten Typen I und II (nach WIGGLESWORTH 1953) kurz charakterisiert werden, wobei wir uns auch an WATERHOUSE (1953) anlehnen.

Die Liste der Insektenfamilien, die sich durch eine PM nach Typ I oder II auszeichnen, geben wir möglichst vollständig, wobei zu bemerken ist, daß die Zahl der Insektenarten mit nachgewiesener PM ständig wächst. Es wird sogar nötig sein, daß gewisse frühere Untersuchungen, bei welchen keine PM gefunden wurde, auf Grund neuerer Erkenntnisse nachgeprüft werden. Speziell Typus III ist, wie wir noch sehen werden, leicht zu übersehen,

wenn die Untersuchung nicht im richtigen Zeitpunkt durchgeführt wird.

Peritrophische Membran: Typ I. Der erste Typus findet sich bei Thysanura, Embioptera, Mallophaga, Coleoptera, Hymenoptera, Mecoptera, bei einigen Familien der Lepidoptera und bei zahlreichen Diptera (Nematocera und Orthorapha). Bei einigen blutsaugenden Arten der letztgenannten Gruppe tritt eine abweichende Bildung auf, die später diskutiert wird.

Die Membran besteht in diesen Fällen aus mehreren dünnen, unabhängigen oder doch nur locker verbundenen konzentrischen Lamellen. Sie entsteht durch Ausscheidung und periodische Delamination aus dem Epithel des Mitteldarmes. Diese Zellen besitzen gewöhnlich einen Stäbchensaum, und jede neue Schicht der Membran bildet sich an dessen Grunde und wird durch die fortgesetzte Sekretausscheidung abgehoben und losgelöst. Oft zeigen die frisch gebildeten Lamellen, wenn sie gefärbt werden, polygonale Flächen, die den Zelloberflächen entsprechen, von denen sie abgelagert wurden. Solche Membranlamellen werden bei Zygoterennymphen bis zu 5 und bei Larven von Bienen und Wespen bis zu 6 im Tag gebildet. Die im Darm enthaltene Nahrung kann also von einer Mehrzahl von Schichten eingehüllt sein.

Peritrophische Membran: Typ II. Den zweiten Typus finden wir bei Dermaptera (Ohrwürmer), einigen Familien der Lepidoptera, bei vielen Dipterenlarven und bei adulten Cyclorapha. Hier besteht die PM aus einer einzigen einheitlichen Schicht. Sie wird in visköser Form von einer ringförmig angeordneten Zellgruppe des Proventrikels am Übergang von Oesophag und Mitteldarm abgegeben. Eine gutentwickelte, oft komplexe oesophagale Invagination ist charakteristisch für Insekten, die eine Membran vom zweiten Typ bilden. Allerdings kommt eine solche Einstülpung auch bei Insekten ohne Membran vor sowie auch bei solchen, die den Typ I produzieren.

Diese Invagination ist nun so gebaut, daß sie als Presse auf die visköse Flüssigkeit wirken kann, die vom innern Zellpolster abgeschieden wird. Sie kann auch die verfestigte Membran mit einem System von Muskeln und Zähnnchen nach hinten schieben. Die PM dieses zweiten Typs wird kontinuierlich gebildet und besitzt auf ihrer ganzen Länge dieselbe Lumenweite. Wo Divertikel des Mitteldarmes bestehen, überbrückt sie diese, ohne einzudringen. Durch den ständigen Zuwachs an der Bildungsstelle kann die Membran eine Länge erreichen, die über den Mittel- bis weit in den Enddarm reicht und bei den Stechmückenlarven gelegentlich als ungebrochene Röhre aus dem Anus hervorragt. Die Intima des Enddarmes trägt oft nach hinten gerichtete Zähnnchen, die dazu

beitragen, die PM nach hinten zu ziehen oder auch zu zerreißen. Die Bildungsgeschwindigkeit wird offensichtlich durch Nahrungsaufnahme gefördert und kann bis zu 6 mm in der Stunde betragen (WATERHOUSE 1954).

Es existiert auch eine Kombination dieser beiden Entstehungstypen. Bei *Calotermes*, *Bombyx mori*, *Tineola*, *Polistes*, *Apis* und weiteren Insekten wurde eine PM doppelten Ursprungs gefunden, indem sich einerseits an der Invagination die «strumpfartige» Membran bildet, während andererseits im hinteren Teil des Mitteldarmes noch Lamellen als Epithelausscheidungen zugefügt werden.

b) Peritrophische Membran bei *Aedes aegypti*.

Der Kern dieser Arbeit bildete die Frage nach dem Weg der Ookineten aus dem Darmlumen in die Wand. Wie wir aus vereinzelten kurzen Arbeiten (JAGUJINSKAIA 1940, PAL 1943) wissen, findet sich auch bei den Imagines der Anophelen eine PM, die das aufgenommene Blut umhüllt. Über den Bildungstyp und den Feinbau der Membran hatten wir allerdings keinerlei Angaben; auch in den zur Verfügung stehenden Lehrbüchern (IMMS, WIGGLESWORTH, WEBER) wird dieses Kapitel immer nur kurz gestreift. Das rührt wohl zum Teil daher, daß man noch nicht zu einer allgemein anerkannten Auffassung über die Natur der Membran gekommen ist und sich die Meldungen über das Vorhandensein bei den verschiedenen Insektenfamilien und -arten widersprechen. Ausführlichere Arbeiten sind erst in jüngster Zeit erschienen (MERCER & DAY 1952, WATERHOUSE 1953). Beim *Cyclus* der Trypanosomen in der Tsetse-Fliege wird die Membran nach der Aufnahme des infizierten Blutes hinten im Enddarm von den Erregern umwandert und später nach einem Aufenthalt im extraperitrophischen Raum nahe der Bildungsstelle, wo die PM noch weich ist, perforiert. Da WIGGLESWORTH (1930) für die Larven von Stechmücken die gleiche Bildungsweise der Membran nach Typus II beschrieb, wie sie von den Glossinen bekannt ist, glaubten wir, daß dies auch für die adulte *Aedes* gelte. Diese Annahme sollte sich aber bald als irrig herausstellen; wir geben im folgenden eine kurze Schilderung des Vorgehens und der Ergebnisse.

Untersuchung auf Schnitten.

Auf zahlreichen Schnittserien (längs und quer), die von herauspraeparierten Därmen ungefütterter weiblicher *Aedes*-Mücken angefertigt wurden, fanden sich nie die geringsten Spuren einer peritrophischen Membran, weder im Mittel- noch im Enddarm. Die Resultate waren negativ sowohl bei 10 frischgeschlüpften als auch

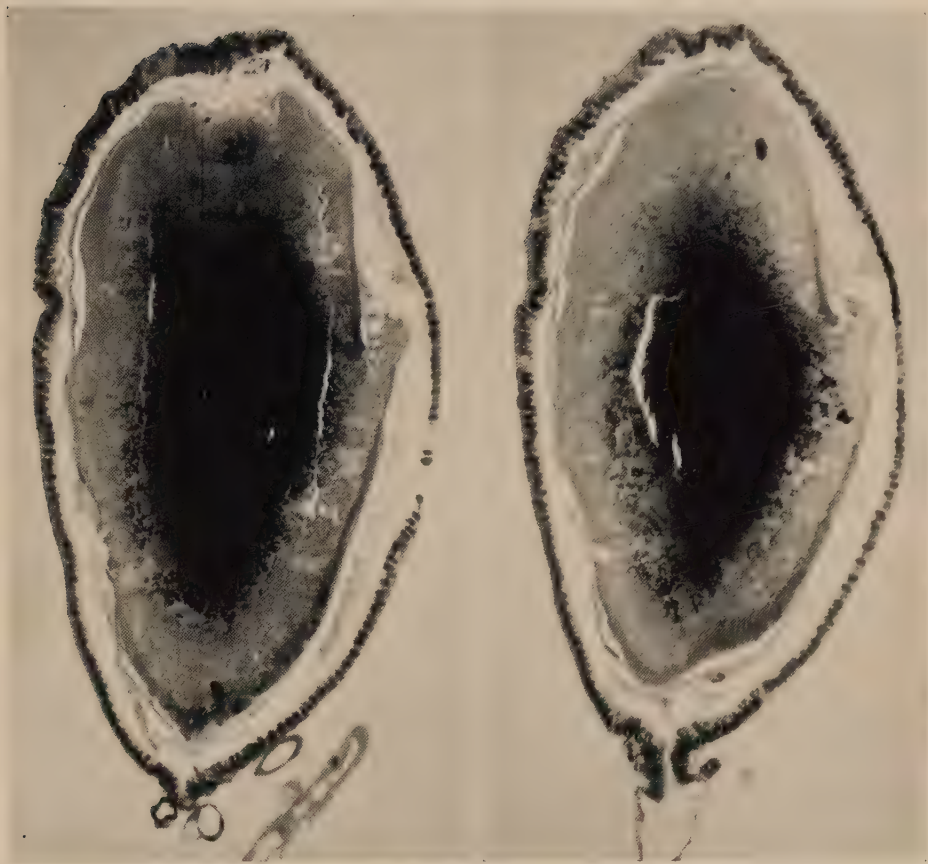
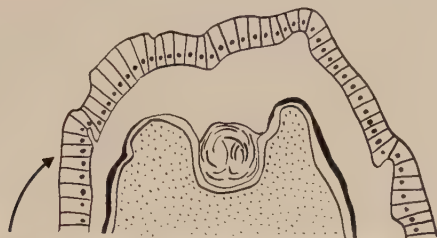


Abb. 1.

Abb. 2.

Abb. 1. Längsschnitt durch einen gefüllten Aedesmagen 28 Std. nach der Blutmahlzeit (Vergr. ca. $85\times$). PM umgibt das Blut vollkommen (rechts bei der Sektion beschädigt). Oben eingesenkt der ursprünglich in den davorgelegenen engen Mitteldarmabschnitt ragende Teil der Membran (vgl. Skizze). Im Zentrum die schwarzgefärbten, unverdauten Erythrocyten. Extraperitrophischer Raum mit Verdauungsprodukten. Unten angeschnittene Malpighische Gefäße.

Abb. 2. Gleiche Schnittserie. Hintere Partie der PM deutlich sichtbar. Einschluß in der Membran. Unten Pylorussphincter und Enddarm.

bei 13 älteren Hungermücken, die vordem mehrmals gefüttert worden waren.

Auf Schnitten, die von 65 Individuen einige Stunden nach der Blutaufnahme angefertigt wurden, zeigte es sich dagegen regelmäßig, daß der Darminhalt nicht direkt dem Epithel auflag, sondern daß eine schmale, nicht zelluläre Schicht dazwischenlag. Unsere Aufmerksamkeit richtete sich hauptsächlich auf Anfang und Ende des Mitteldarmes, wo wir den Durchtritt der Ookineten erwarteten. Am Übergang vom Oesophag zum Mitteldarm fand sich aber nicht die ausgeprägte Invagination, wie sie für die Larven der Aedes beschrieben ist und für die Bildung des Membrantyps I erwartet werden mußte. Die Membran trat erst im erweiterten Teil, dem Magen, in Erscheinung und bietet dort folgendes Bild:

Im vordersten Abschnitt erfüllt sie den Raum zwischen Mageninhalt und Darmwand in Form eines wirren Knäuels (vergleiche Abb. 1) und kann auch in den engern vordern Teil des Mitteldarmes hineinragen. Nach hinten bildet sie eine glattgespannte dicke Schicht, die den Raum zwischen Darminhalt und Epithel vollkommen ausfüllt und sich auf der Außenseite den Unregelmäßigkeiten des Darmepithels anschmiegt (vergl. Abb. 4 A). Im hintern Abschnitt verdickt sie sich noch mehr und schließt gegen den mit einem Sphincter verschlossenen Enddarm zu in glatter Rundung ab, ohne in diesen einzudringen (vergl. Abb. 2).

Mit zunehmender Verdauung ändert sich das Bild. Die Membran wird dünner und liegt dem teilweise verdauten Blut eng an, unter gleichzeitiger Abhebung vom Epithel. Manchmal zeigt sie Falten und mehrere Schichten. Es können auch kleinere Einschlüsse darin liegen (vergl. Abb. 2). An der Peripherie der eingeschlossenen Blutmasse macht sich nun der Verdauungsvorgang bemerkbar, indem die Blutzellen längs der Membran ihre Struktur verlieren und sich mit Azan nicht mehr dunkelblau, sondern nur noch hell anfärben. Der entstandene extraperitrophische Raum ist gefüllt mit Sekreten und Abbauprodukten der Blutmahlzeit.

Eine Erschwerung der Untersuchung ergab sich dadurch, daß die Membran sowohl nach Azan- (blau) als auch bei der Haematoxylin-Heidenhain-Färbung (bräunlich) die gleiche Tönung annahm wie das anliegende Blut. Durch genügendes Ausdehnen der Schnittbänder beim Aufkleben konnte jedoch eine streckenweise Loslösung vom anhaftenden Blutkuchen provoziert werden, was das Auffinden der dünnen Membran im Längsschnitt erleichterte.

Praeparieren der Membran bei lebendfrischen Tieren.

Diese histologischen Befunde mußten selbstverständlich durch direkte Beobachtungen bei Frischsektionen ergänzt werden. Se-

ziert wurde unter einem Binocular mit zwei scharfen Uhrmacherpinzetten in Insektenringerlösung oder in physiologischer Kochsalzlösung. Um keinerlei Zug auf den Darm auszuüben, wurden als erstes die beiden Endsegmente vorsichtig von den andern gelöst, hierauf das Abdomen an der Grenze zum Thorax durchgetrennt und zum Schluß die den Mitteldarm einschließenden Abdominalsegmente aufgetrennt. So ging man sicher, daß eventuelle Verbindungen zwischen Membran und Darmepithel nicht zerstört wurden. Sorgfältiges Längsschlitten des Magens gab den Inhalt zur Beobachtung frei. Und da bestätigte es sich, daß wir es bei Aedes mit einem andern, neuen Typ von PM zu tun haben.

In leeren jungen und alten Därmen konnten wir in Übereinstimmung mit den Befunden auf Schnitten keine Spuren der PM entdecken. Im Magen von frischgefütterten Mücken war der Blutklumpen hingegen umschlossen von einer gelatinösen, durchsichtigen Masse, die an Epithel und Blut haftete und sich nicht ablösen ließ. 24 Stunden nach der Blutmahlzeit hatte sich die Situation verändert. Die PM zeigte sich nun als verfestigte, feine Kapsel, die das in den Magen aufgenommene Blut vollständig umhüllte. Sie steht in keiner Verbindung mehr mit dem Epithel, zeigt am vorderen Ende meist eine kleine, hütchenartige Ausbuchtung, die ein kleines Stück in den engen Mitteldarmabschnitt eindringt; hinten ist sie blind geschlossen.

Zeitlicher Ablauf der Bildung auf Grund von Autopsien.

Die bisherigen Resultate zeigen, daß die Bildung der PM ein Vorgang ist, der in der Mücke stets unmittelbar nach der Blutaufnahme einsetzt. Wie schon erwähnt, gelangt aufgenommenes Honigwasser nicht in den Magen, sondern wird infolge Kontraktion des Cardiacalsphincters in den davorliegenden oesophagalen unpaaren Divertikel gelenkt. Da von hier aus die Überleitung an den Darmkanal successive erfolgt, kann diese Nährflüssigkeit die Bildung der PM gar nicht induzieren. Die Weibchen, die erst Nektar aufgenommen haben, und die männlichen Aedes, die sich nur von Honigwasser ernähren, besitzen deshalb keine solche.

Die nächste Aufgabe bestand nun darin, den Bildungsvorgang genauer zu untersuchen und zeitlich festzulegen. Von besonderem Interesse war dabei, wie sich später im Zusammenhang mit dem Infektionsgang zeigte, den Einfluß der Temperatur auf die Verfestigung der Membran festzustellen.

Für diese Untersuchungen ließen wir die Aedes auf Meer-schweinchen saugen, verbrachten sie in kleine Gazekäfige und hielten sie bei verschiedenen Temperaturen bis zum gewünschten



Abb. 3. Submikroskopische Struktur der peritrophischen Membran von *Aedes aegypti*. Goldbeschattung. Vergrößerung ca. 28 800fach. (Membran verunreinigt mit Verdauungsrückständen.)

Zeitpunkt nach der Blutaufnahme. Im Zuchtraum herrschte eine Temperatur von 26°C , während wir in einem Stufenthermostat Kammern mit 21°C , $17,5^{\circ}\text{C}$ und $13\text{--}14^{\circ}\text{C}$ wählten. In diese Kammern wurde eine Schale mit feuchtem Fließpapier gestellt, um die nötige Luftfeuchtigkeit zu erzeugen.

In den nun folgenden Autopsien handelte es sich darum, die jeweilige Konsistenz der Membran und den Zustand der Verdauung zu beurteilen und die Stufen der Veränderungen möglichst genau zu charakterisieren. Wir sind uns bewußt, daß derartige Beurteilungen stets etwas subjektiv sind, doch war dies die einzige Möglichkeit, vergleichbare Resultate zu erhalten. Wir suchten diese Fehlerquelle durch Wiederholungen zu kompensieren und kamen auf Grund von 5 Versuchen zu folgenden gesicherten Resultaten.

Immer wieder bestätigten sich die bereits am Ende des letzten Abschnittes beschriebenen Zustandsänderungen der PM. Unmittelbar nach Blutaufnahme war diese noch gar nicht vorhanden. Erst nach einigen Stunden (siehe Tab. 2) umschloß sie als visköse farblose Schicht die Blutmasse, welche noch keinerlei Anzeichen von Verdauung zeigte. Etwas später verfestigte sich die PM von hinten

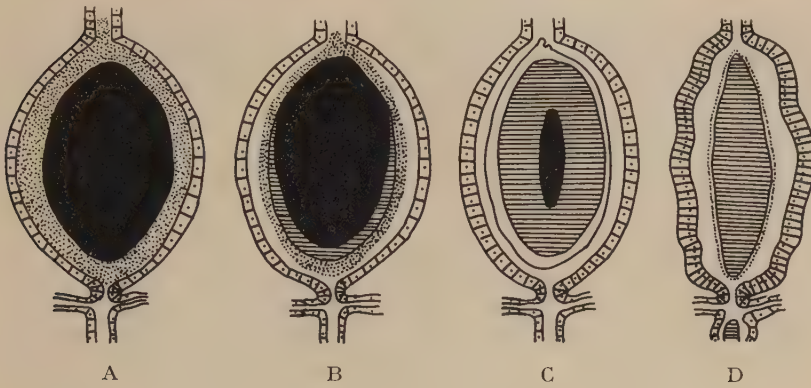


Abb. 4. Schematische Darstellung der verschiedenen Darmzustände.

- A PM viskös, dick. Raum zwischen Epithel und Blut ausfüllend. Keine Anzeichen von Verdauung. Epithelzellen abgeflacht.
- B PM dünner. Beginn der Erhärtung. Löst sich vom Epithel. Verdauung peripher von hinten nach vorne greifend im Gange.
- C PM erhärtet. (Ist zur besseren Darstellung vom Blut abgelöst gezeichnet.) Extraperitrophischer Raum ist entstanden. Verdauung fortgeschritten.
- D PM wieder erweicht. Verdauung beendet. Erste Kotabgabe in den Enddarm. Epithel bildet Falten.

nach vorne, behielt noch ihre Elastizität, wurde aber zusehends dünner. Zu diesem Zeitpunkt setzte die Verdauung von hinten her ein. Sodann erstarrte die PM zu einer derben Haut, die ihre Elastizität immer mehr verlor und zunehmend erhärtete. In diesem Zeitpunkt war die Membran als Ganzes gut ablösbar und durch anhaftende Abbauprodukte des Blutes bräunlich gefärbt. Die Verdauung hatte jetzt weitere Partien des Blutkuchens erfaßt. Schließlich wurde die PM starr und brüchig, so daß sie beim geringsten Zug oder Druck, der auf den Darm ausgeübt wird, platzte. Es folgte dann eine Periode der Wiedererweichung, daran zu erkennen, daß die Membran trotz der Verminderung des Volumens des Mageninhaltes sich nicht etwa in Falten legte, sondern dem verringerten Darminhalt anlag und nicht mehr als Säckchen abgelöst werden konnte.

Die fortschreitende Einwirkung der vom Epithel sekretierten Verdauungsenzyme wird auf dem Frischpräparat erkannt an einem allmählichen Umschlag der anfänglich hellroten Färbung des Blutes in Braunrot. Sie beginnt an der Peripherie des Blutkuchens vornehmlich hinten und greift nach vorne über, wobei sich das gelatinöse Blutkoagulat successive verflüssigt. Die letzten unveränderten Erythrozyten finden sich im Zentrum desselben. Zur Erläuterung der eben geschilderten Vorgänge sind auf Abb. 4 verschiedene Darmzustände schematisch dargestellt.

TABELLE 1.
Änderungen im Zustand der peritrophischen Membran und der Verdauung.

Zustand der Membran	viskös, dick	hinten dünner, vorne schwach viskös	dünn, elastisch	fester, weniger elastisch	fest, brüchig	wiedererweichend
Zustand der Verdauung	kaum sichtbar	sehr schwach	stärker, besonders hinten und an der Peripherie	im ganzen Magen außer im Zentrum	beinahe beendet	beendet
Symbol	+	++	+++	++++	+++++	+++++

Diese Beobachtungen gestatteten uns, den Verfestigungs- und Verdauungsvorgang in einzelne Schritte zu zerlegen, die in Tab. 1 mit Symbolen bezeichnet sind.

Auf Grund von an Schnitten und Vorversuchen gewonnenen Einsichten sind die Autopsien in verschiedenen Zeitabschnitten zwischen der 2. und 48. Stunde nach dem Saugakt durchgeführt worden. Nach diesem Zeitpunkt beginnt bei einer Temperatur von 26° C die Abgabe von Verdauungsrückständen in den Enddarm. Auf jeder Stufe seziierten wir 3—4 Mücken und sicherten die Ergebnisse durch wiederholte Kontrollen.

Da es sich herausstellte, daß sich die Succession der Membranbildung und Verdauung bei verschiedenen Temperaturen nicht veränderte, können in Tab. 2 beide Vorgänge in einem Symbol (+, ++ usw.) zusammengefaßt werden.

TABELLE 2.
Zusammenhänge zwischen Temperatur und Zustand des Darminhaltes (PM und Blut) bei *Aedes aegypti*.

	Stunden nach Blutaufnahme								
	2	5	8	12	17	22	24	40	48
13–14°					+	++	++	+++	++++
17,5°			+	++	++	+++	++++	++++	++++
21°		+	++	+++	++++	++++	++++	+++++	+++++
26°		+	++	+++	++++	++++	++++	+++++	+++++

Tiefe Temperaturen hemmen bekanntlich den Stoffwechsel poikilothermer Tiere. So finden wir auch hier bei verminderter Temperatur, und zwar erst unter 20° C, ein späteres Einsetzen der Verdauung und der Membranbildung. Die Verfestigung der Membran scheint kein unabhängiger physikalischer Vorgang zu sein, sondern mit der Verdauung in direktem Zusammenhang zu stehen. Es ist noch nicht abgeklärt, ob die Verdauungsenzyme, ein pH-Wechsel im Darminhalt oder dergleichen dafür verantwortlich sind. Immerhin sei auf die Feststellungen von BISHOP & MCCONNACHIE (1956) hingewiesen, wonach im Innern des gefüllten Aedes-Darmes ein hohes pH von im Mittel 7,78 herrschen soll, das sich allerdings mit fortschreitender Verdauung nicht mehr ändert.

Submikroskopische Struktur.

Nach Arbeiten von RICHARDS & KORDA (1948), HUBER (1950), HUBER & HAASSER (1950), MERCER & DAY (1952), MARTIGNONI (1952), HUBER (1954) und WILDBOLZ (1954) über die submikroskopische Struktur der peritrophischen Membran bei verschiedenen Insektenarten können wir zwei Membrantypen unterscheiden:

1. Membranen mit deutlicher Fibrillierung und Netzwerkstruktur (Maschen), überzogen mit einem Proteinfilm; nachgewiesen bei *Dixippus morosus* (Orth.), *Periplaneta orientalis* und *americana* (Orth.), *Locusta migratoria* (Orth.), *Tenebrio molitor* (Col.), *Melolontha vulgaris* (Col.), *Geotrupes silvaticus* (Col.) und *Galleria melonella* (Lepid.).
2. Membranen mit einer Streuungstextur, ohne geordnete Fibrillierung, erstmals beschrieben bei der Larve von *Peridroma margaritosa* (Lepid.) von MARTIGNONI (1952). Auch die PM von *Bombyx mori* (Lepid., HUBER 1950) scheint diesem Typ anzugehören.

Die Untersuchungen an *Aedes aegypti* wurden mit dem Trübtäuber-Elektronenmikroskop am Chemischen Institut der Universität Bern durchgeführt.

Die Praeparation erfolgte unter dem Binocular in physiologischer Kochsalzlösung. Nach mehrmaligem Spülen wurden die Membransäckchen in Bakterienprotease (Ferment AG., Basel) verbracht und über Nacht stehengelassen, um anhaftende Blutreste und einen eventuellen Proteinfilm aufzulösen. Anderntags wurden die Membranstücke auf den mit einem feinen Kollodiumfilm überzogenen Objektträgernetzchen ausgebreitet. Nach einigen Stunden Trocknen bei Zimmertemperatur wurde ein Teil der Objekte beschattet und war somit zur Untersuchung bereit.

Die unbeschatteten Präparate erschienen bei der direkten Beob-

achtung im EM vollkommen homogen und zeigten keinerlei Struktur. Dagegen trat bei beschatteten Membranen eine deutliche Fibrillierung hervor mit regelloser Anordnung der einzelnen Micellen (Abb. 3, S. 312), ähnlich den bei *Peridroma margaritosa* beschriebenen Verhältnissen (MARTIGNONI 1952).

Somit gehört *Aedes aegypti* zur Gruppe der Insekten, die eine Streuungstextur aufweisen.

Wie von HUBER (1954) angeregt, lassen sich die zwei Strukturarten, Netzwerk- und Streuungstextur, trotz einer relativ geringen Zahl von Untersuchungsbefunden mit großer Wahrscheinlichkeit den Membrantypen I und II zuordnen.

Wird die peritrophische Membran durch Delamination (I) gebildet, so weist sie ein Netzwerk auf. MERCER & DAY (1952) vermuten, daß bei dieser Bildungsart, wo sich die Membran bekanntlich an der Basis des Fransenbelages der Epithelzellen bildet, die Fibrillen entsprechend der Anordnung der einzelnen Stäbchen orientiert werden und die abgelöste Membran je nachdem eine hexa- oder tetragonale Maschenstruktur zeigt. Diese Deutung ist bestechend, benötigt aber noch weiterer Abklärung, besonders in bezug auf den Stäbchensaum, dessen Bauplan etwas umstritten ist. Man nimmt an, daß dieser Saum von zweierlei Art sein kann: 1. der Typus des «Wabensaumes», welcher aus einer großen Zahl zu einer zähen Palisade verschmolzener stäbchenartiger Hohlkörper zusammengesetzt scheint, und 2. der Typus des «Bürstensaumes», der aus einem fransenartigen Besatz der Zellkuppe besteht. Das Vorkommen dieser beiden Typen ist nicht mit Sicherheit festgestellt, da sie im Schnittpräparat nicht mit Gewißheit unterschieden werden können. Dafür müßte aber zur Konsolidierung der Mercer'schen Theorie noch ein Weg gefunden werden.

Entsteht dagegen die Membran durch Verfestigung der als Sekret vom Proventrikel oder direkt vom Epithel aus abgegebenen Substanz im Lumen des Darmes, wie es beim Typ II und auch im Falle der *Aedes* vorkommt, so können wir die sog. Streuungstextur erwarten. Tatsächlich scheint *Glossina palpalis* nach allerdings rudimentären Untersuchungen (HUBER 1954) diese Struktur aufzuweisen. Weitere Forschungen auf diesem Gebiet müßten die Richtigkeit unserer Theorie noch erhärten.

3. Diskussion der Resultate.

Auf Grund von Schnitten, Sektionen und Untersuchungen im Elektronenmikroskop kommen wir somit zu folgender Auffassung über die peritrophische Membran von *Aedes aegypti*:

Im frischgeschlüpften und im ungefütterten Insekt ist sie nicht

vorhanden. Erst nach der Blutmahlzeit wird vom gesamten Magenepithel ein Sekret abgegeben, das die aufgenommene Blutmasse vollkommen umgibt. Diese visköse Substanz erstarrt allmählich und wird zur peritrophischen Membran. Anfänglich noch weich und elastisch, erhärtet sie und wird schließlich hart und brüchig. Gegen Ende des Verdauungsprozesses erweicht sie wieder und wird mit den unverdaulichen Nahrungsresten ausgeschieden. Aufgenommenes Honigwasser induziert die Bildung nicht, und ihr Vorkommen ist daher ausschließlich auf weibliche Mücken beschränkt, nachdem sie Blut aufgenommen haben. Submikroskopisch zeigt die fertig ausgebildete PM eine sog. «Streuungstextur», die bisher erst bei einer Lepidopterenlarve (*Peridroma margaritosa*) sicher nachgewiesen ist.

Eine peritrophische Membran ist bei einer Anzahl von adulten Nematocera nachgewiesen worden. So bei Tipuliden im Falle von *Tipula* sp. (AUBERTOT 1934), bei Culiciden in *Culex pipiens* (SCHAUDINN 1904), *C. fatigans* (PAL 1943), *Anopheles maculipennis* (JAGUJINSKAIA 1940), *A. culifacies*, *A. stephensi* und *A. subpictus* (PAL 1943), bei Psychodidae in *Phlebotomus papatasi* (ADLER & THEODOR 1926 und DOLMATOVA 1942), *P. chinensis*, *P. mongolensis* und *P. squamirostris* (FENG 1951), bei Simuliidae in *Simulium damnosum* und *S. griseicollis* (LEWIS 1950) und endlich bei Chironomidae in *Culicoides nubeculosus* (MEGAHED 1956).

JAGUJINSKAIA erkannte erstmalig, daß die Membran in *A. maculipennis* nur im Anschluß an die Blutmahlzeit gebildet wird und erleichterte damit ihr Auffinden bei weiteren blutsaugenden Nematocera.

WATERHOUSE (1953) stellte als Erster bei der adulten *Aedes aegypti* die peritrophische Membran fest und wies ihren chitinösen Charakter nach.

All diese aufgezählten Beispiele lassen erkennen, daß wir es hier mit einem von den bisherigen Typen I und II (WIGGLESWORTH 1953, DAY & WATERHOUSE 1953 und IMMS 1951) abweichenden Bau zu tun haben, und wir schlagen auf Grund unserer detaillierten Untersuchungen an *Aedes aegypti* die Unterscheidung eines Typus III vor, der von den andern hinsichtlich Entstehungsart und Struktur verschieden ist.

Die drei Typen sind wie folgt charakterisierbar:

Typ	Entstehungsart	Submikroskopische Struktur
I	Abguß des Stäbchensaumes, Delamination . .	Netzwerkstruktur
II	vom Proventrikel aus	Streuungstextur
III	visköse Ausscheidung des Magenepithels . .	Streuungstextur
	(bildet sich ad hoc jedesmal nach Blutaufnahme)	

III. Untersuchungen über die Lage der Oocysten auf dem Mitteldarm.

1. Versuche und Resultate von SHUTE mit *Anopheles* und menschlichen Plasmodien.

Die in der Einleitung erwähnte ungleiche Verteilung der Malariaoocysten auf dem Mitteldarm der Überträger veranlaßte HUFF (1934), diesem Problem nachzugehen. Er kam auf Grund seiner Untersuchungen zum Schlusse, die einseitige Verteilung sei der Wirkung der Schwerkraft auf das Blutcoagulum zuzuschreiben, welches die Ookineten bei normaler Ruhestellung der Mücken in den hintern Magenteil hinunterzieht.

1935 untersuchte SHUTE die Wirkung des Speichels von *Anopheles maculipennis* auf menschliches und tierisches Blut. Es ergab sich, daß innerhalb weniger Sekunden nach Blutaufnahme infolge Coagulation eine deutliche Zusammenballung der Erythrocyten eintritt. (SHUTE verwendet den Ausdruck «Agglutination», der aber nach einer persönlichen Mitteilung von Herrn Prof. Tomcsik, Basel, nur im streng bakteriologischen Sinne verwendet werden sollte).

In Ruhestellung (Kopf nach oben) sammelt sich dieses Coagulat oder Konglomerat im hintern Magenteil an, während das vordere Ende durchsichtig erscheint und mit dem farblosen Serum gefüllt ist.

Auf diese Beobachtungen stützt sich SHUTE in einer weiteren Arbeit (1938), um das Problem der Cystenverteilung experimentell anzugehen. Wie bereits schon HUFF (1934), wollte er die Schwerkraft in entgegengesetzter Richtung auf die Mücken wirken lassen und schob sie deshalb augenblicklich nach der infektiösen Blutmahlzeit in enge Glaskapillaren, die dann beidseitig mit einem Wattepföpfchen verschlossen wurden. So war es möglich, die Mücken zwangsmäßig in Kopflage zu halten. Erwartungsgemäß sammelten sich dabei die Erythrocyten im vordern Magenteil an.

Die Insekten wurden 48 Stunden in dieser Lage belassen, um den Ookineten das Eindringen in die Darmwand zu gestatten, anschließend befreit und bis zur Sektion am 8. Tage bei 24° C normal gehalten. Da nur ca. 20% der Versuchstiere die Kopflage überlebten, war es nötig, eine große Zahl zu verwenden, um genügend Resultate für den Vergleichsversuch (Normallage) zu erhalten.

Die der Arbeit beiliegenden Mikroaufnahmen von infizierten Därmen zeigen zum Teil sehr deutlich die erwartete einseitige Cystenverteilung. Je nach Intensität der Infektion ändert sich das Bild, indem bei schwachem Befall etwa die Hälfte des Magens von Cysten frei bleibt, bei mittlerem nur ein Drittel desselben, bei sehr

starker Infektion bloß ein schmales Band. Diese unbefallenen Darmpartien befinden sich je nach der auf die Blutmahlzeit folgenden Stellung nach dem «Sanduhr-Prinzip» entweder vorne oder hinten.

SHUTE kam deshalb zum Schlusse, daß die auf die Blutkonglomerate wirkende Schwerkraft weitgehend für das Phänomen der einseitigen Verteilung verantwortlich sei.

Die gleichen Versuche machte er auch mit *Aedes aegypti*. 1935 hatte er aber festgestellt, daß der Speichel der Aedes nicht die gleiche Wirkung auf das Blut ausübt wie derjenige von Anopheles. Anstelle einer auf Coagulation beruhenden Schichtung bildet sich im Magen ein einheitlicher gelatinöser Blutkuchen ohne wesentliche Serumabscheidung. Aus diesem Grunde erwartete er nicht dieselben Resultate wie bei Anophelen, und die allerdings nicht sehr zahlreichen Befunde schienen ihm dies zu bestätigen. Hier sei nochmals daran erinnert, daß SHUTE sich gar nicht um die PM gekümmert hat, da sie ja damals bei den Stechmücken noch nicht nachgewiesen war.

Leider wertete SHUTE seine Versuche nicht zahlenmäßig aus, so daß uns für die in der Folge beschriebenen Ergebnisse nur wertvolle Hinweise, jedoch kein Vergleichsmaterial zur Verfügung stand.

2. Eigene Versuche mit *Aedes aegypti* und *Plasmodium gallinaceum*.

a) Technik.

Infektion: Unser Ziel war, eine große Anzahl von gutinfizierten Mücken zur Verfügung zu haben. Es kamen deshalb keine frisch geschlüpften Aedes in den Versuch, da diese nur zögernd zur Blutaufnahme schreiten. Die besten Ergebnisse erzielt man mit mehrmals gefütterten Individuen, deren letzte Blutmahlzeit ca. 4 Tage zurückliegt. Die Auswahl geschah so, daß die durch einen Handschuh geschützte Hand in den Flugkäfig gestreckt, und die stechlustigen Mücken mit einem Saugrohr weggefangen wurden. So bestand die Gewähr, daß nur sehr hungrige Tiere auf das Wirtstier kamen und der größte Teil sofort zum Stechakt schritt.

Die wichtigste Voraussetzung für einen guten Infektionsgrad ist die Wahl des Zeitpunktes, an dem die Mücken auf dem malaria-kranken Küken angesetzt werden. Dieser liegt nach unserer Erfahrung, die auch mit den Ergebnissen von HUFF & MARCHBANK (1954) in Übereinstimmung steht, etwas vor dem maximalen Parasitenbefall des Hühnchenblutes. Durch vorausgehende mikroskopische Kontrollen wurde der günstige Zeitpunkt festgestellt. Wir

werden in der Diskussion nochmals auf diesen Punkt zu sprechen kommen.

Haltung der Mücken nach der Infektion: In unseren Versuchen hielten wir die Aedes auf 3 verschiedene Weisen:

1. In Normallage ohne Zwang. Die Mücken befanden sich dabei in einem Lampenglas und besaßen volle Bewegungsfreiheit.
2. In normaler Zwangslage, d. h. Kopf nach oben in Glaskapillaren.
3. In invertierter Zwangslage, mit dem Kopf nach unten.

Um die Mücken in Zwangslage zu halten, verwendeten wir, in Anlehnung an SHUTE, Glaskapillaren. Sie wiesen eine Länge von 5 cm und einen Innendurchmesser von 2 mm auf, gerade eng genug, um die Mücken in der gewünschten Stellung fixiert zu halten. Um in den Röhrchen die Luftzirkulation nicht ganz auszuschließen, wurden sie an den Enden nicht mit Watte abgeschlossen. Ein kurzes, flaches Holzstückchen, an einem Ende eingeklemmt, bot einen sichern und doch durchlässigen Abschluß, der eben das Entweichen verhinderte. Hierauf schoben wir die vollgesogenen und mit Äther leicht narkotisierten Versuchsmücken mit einem feinen Pinsel (der langen Beine wegen kopfvoran) in die Kapillaren. Diese wurden nun mit einem Gummiband zu einem Bund zusammengefaßt, die unverschlossenen Enden mit einem Gazestück überspannt und das Ganze im Klimaraum frei aufgehängt. Damit war der freie Luftzutritt einigermaßen garantiert. Während 3 Tagen wurden die Mücken in der Zwangslage belassen. Dann befreiten wir sie, was am besten durch Herausblasen aus der Kapillare geschah und hielten sie bis zur Sektion am 9. Tage in Lampengläsern. Für diese Zeit stand ihnen Honigwasser als Nahrung zur Verfügung. Es erwies sich als günstig, ihnen eine Schale mit feuchtem Fließpapier zu bieten. Dadurch wurden sie zur Eiablage veranlaßt, was die Sektion sehr erleichterte.

Verarbeitung der Därme zu Dauerpräparaten: Wie schon bei der Beobachtung der PM, mußte die Sektion auch hier äußerst sorgfältig durchgeführt werden. Wenn starker Zug auf den Darm ausgeübt wurde, hatte dieser die unangenehme Eigenschaft, zu kollabieren und sich einzurollen, was sich bei der zahlenmäßigen Auswertung als äußerst unvorteilhaft erwies. Da ausschließlich der erweiterte Mitteldarmteil, der Magen, von den Cysten besiedelt wird, erfolgt die Durchtrennung im vordern engen Teil. Die Malpighischen Gefäße wurden bis auf kurze Stücke, die für die spätere Orientierung wichtig waren, entfernt. Der ganze Enddarm sowie die beiden letzten Abdominalsegmente wurden nach Möglichkeit bis kurz vor der Einbettung am Objekt belassen, da sie sich bei den zahlreichen Manipulationen, denen der Darm bis zum fertigen



Abb. 5. Skizze der Darstellungsweise eines infizierten Darmes.

Präparat unterworfen werden mußte, als ideale Anfaßpunkte erwiesen. Wir fixierten mit Formol und die Färbung erfolgte nach der Versilberungsmethode von RIO HORTEGA in einer Modifikation von NIETO-CAICEDO (Rezept in GEIGY & HERBIG 1955, S. 403). Glückt diese Färbung, was aus unerklärlichen Gründen nicht immer der Fall ist, so liefert sie sehr befriedigende Resultate. Die fast schwarz gefärbten Cysten heben sich deutlich vom graugetönten Darmgewebe ab und diejenigen auf der Präparatunterseite scheinen deutlich durch.

Auswertung der Präparate: Die Umrisse jedes Darmes und der darauf befindlichen Oocysten übertrugen wir bei schwacher mikroskopischer Vergrößerung mittels Zeichenapparat auf Millimeterpapier. Der Abschnitt zwischen dem Übergang vom engen zum erweiterten Mitteldarmteil und der Einmündungsstelle der Malpighischen Gefäße wurde auf der Skizze in 8 gleich große Abschnitte aufgeteilt und mit Querstrichen markiert (Abb. 5).

Diese Darstellungsmethode ermöglichte es uns, die Lage jeder einzelnen Cyste genau festzustellen und die Verteilung auf dem Magen zahlenmäßig zu erfassen und auszuwerten.

b) Cystenverteilung bei normalem Infektionsverlauf.

In diesem Versuch wurden die Aedes nach der infektiösen Blutmahlzeit unter normalen Bedingungen, d. h. im Klimaraum bei 26° C Wärme und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85—90%, in Lampengläsern gehalten. Sie hatten volle Bewegungsfreiheit, ruhten meist vertikal mit dem Kopf nach oben an der Wand des Gefäßes, saßen aber auch horizontal am Boden oder an der Gazebspannung, die das Glas nach oben abschloß.

Nachdem 62 Versuchsmücken Blut aufgenommen hatten, kamen bei einer Mortalität von 3,3% 60 Därme zur Auswertung, wovon sich 52 als infiziert erwiesen.

Um vergleichbare Resultate zu erlangen, addierten wir die Anzahl der Cysten, die sich in den entsprechenden Abschnitten der insgesamt 52 Därme befanden. Die erhaltenen 8 Zahlen erlaubten uns, die durchschnittliche prozentuale Verteilung zu berechnen, wie die folgende Zusammenstellung zeigt.

TABELLE 3.
Zahlenmäßige und prozentuale Verteilung der Oocysten
bei normalem Infektionsverlauf in 52 Mücken.

	Abschnitte							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Cysten	50	185	236	281	254	207	131	33
In %	3,6	13,5	17,2	20,3	18,5	15,0	9,5	2,4

c) Cystenverteilung bei Mücken nach Haltung in Zwangslage.

Normallage mit Zwang. Nach 3tägigem Aufenthalt in Kapillaren wurden die Mücken befreit und bis zum 9. Tage normal gehalten.

134 vollgesogene Mücken kamen in den Versuch, wobei 68 am Leben blieben. Die Mortalität betrug somit 49,2⁰%. Infolge Verlustes während Sektion und Färbung kamen 61 Därme zur Auswertung. Davon erwiesen sich 42 als infiziert. In der Zusammenstellung ergibt sich folgendes Bild:

TABELLE 4.
Zahlenmäßige und prozentuale Verteilung der Oocysten nach Normallage
mit Zwang in 42 Mücken.

	Abschnitte							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Cysten	23	102	141	154	169	132	88	39
In %	2,7	11,8	16,6	18,2	20,0	15,6	10,8	4,6

Kopflage mit Zwang. Für diesen wichtigen Versuch, der uns analog zu Anopheles über die Wirksamkeit des Einflusses der Schwerkraft Aufschluß geben sollte, brachten wir 193 Mücken in

TABELLE 5.

Zahlenmäßige und prozentuale Verteilung der Oocysten nach Kopflage mit Zwang in 55 Mücken.

	Abschnitte							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Cysten	139	290	363	398	354	278	172	68
In %	6,5	14,1	17,6	19,4	17,2	13,5	8,4	3,3

Kopflage. Diese Stellung wurde von den Aedes noch schlechter ertragen und hatte eine Mortalität von 65,8% zur Folge. Von den 66 überlebenden Mücken kamen 65 zur Auswertung. 57 davon erwiesen sich als infiziert. Bei der rechnerischen Auswertung konnten wir aber nur 55 Därme erfassen, weil 2 im Präparat zu große Deformationen aufwiesen.

Wir lassen nun noch eine zusammenfassende Übersicht über das verwendete Mückenmaterial folgen. Bei der Mortalität geben wir keine Durchschnittszahl, da dies wegen der verschiedenen Bedingungen, unter denen die Mücken gehalten wurden, gar nichts aussagen würde. Wir werden uns in der Diskussion noch mit dieser Frage befassen.

Auf das Verhältnis von infizierten zu uninfizierten Mücken wird im Abschnitt d) eingegangen, da die Insekten in Schüben auf verschiedenen Hühnchen angesetzt worden waren. Bei der rechnerischen Erfassung der prozentualen Verteilung der Cysten über den

TABELLE 6.

Zusammenstellung des zur Lagebestimmung der Ookineten verwendeten Mückenmaterials.

	Im Versuch	Über- lebend	Mortalität	Verwertet	Infiziert
Normallage	62	60	3,3 %	60	52
Normallage mit Zwang	134	68	49,2 %	61	42
Kopflage	193	66	65,8 %	65	57
Total	389	194	—	186	151

Darm war dies ohne Bedeutung und wurde deshalb in Tab. 6 nicht berücksichtigt. Um aber über den Infektionsgrad der Aedes eine gültige Aussage machen zu können, mußte dieser für die verschiedenen Schübe einzeln errechnet werden (Tab. 7).

TABELLE 7.

Zusammenstellung des verwendeten Mückenmaterials nach Infektionsserien.

	Infektionsserie			
	I	II	III	IV
sezierte Aedes	60	27	55	42
davon infiziert	52	24	42	31
Infektionsrate	86,7 %	88,8 %	76,4 %	73,8 %
niederste Cystenzahl	4	2	2	2
höchste Cystenzahl	127	41	127	36

d) Infektionsgrad und Oocystenzahl.

Aus den exakten Auszählungen der Cystenzahlen bei zahlreichen *Aedes aegypti* ergab sich die Möglichkeit, Vergleiche anzustellen über die bei den einzelnen Mücken auftretende Zahl. Da die Stärke des Cystenbefalles zum Teil auch abhängig ist von der Zahl der aufgenommenen Gametocyten und die Infektion unserer Versuchsmücken in 4 Serien auf verschiedenen Hühnchen erfolgte, mußte der möglicherweise verschieden starke Infektionsgrad der Gametocytenträger mit berücksichtigt werden. Wir konnten hiefür nicht mehr die in den vorhergehenden Kapiteln erfolgte Aufstellung nach Lage verwenden, sondern fassen jetzt die Resultate der 4 Infektionsserien zusammen.

Wohl waren die beiden Extreme der möglichen Cystenzahlen interessant, doch lagen sie soweit auseinander, daß daraus noch nicht ersichtlich war, in welchem Bereich der Schwerpunkt des zahlenmäßigen Befalles lag. Die Därme wurden deshalb nach der Zahl ihrer Cysten in einer Reihe geordnet, die Zehnergruppen enthielt und von 1—130 reichte. Nach Umrechnung in den prozentualen Anteil pro Stufe ergaben sich Zahlen, die die Unterschiede der 4 Infektionsserien deutlich aufzeigten.

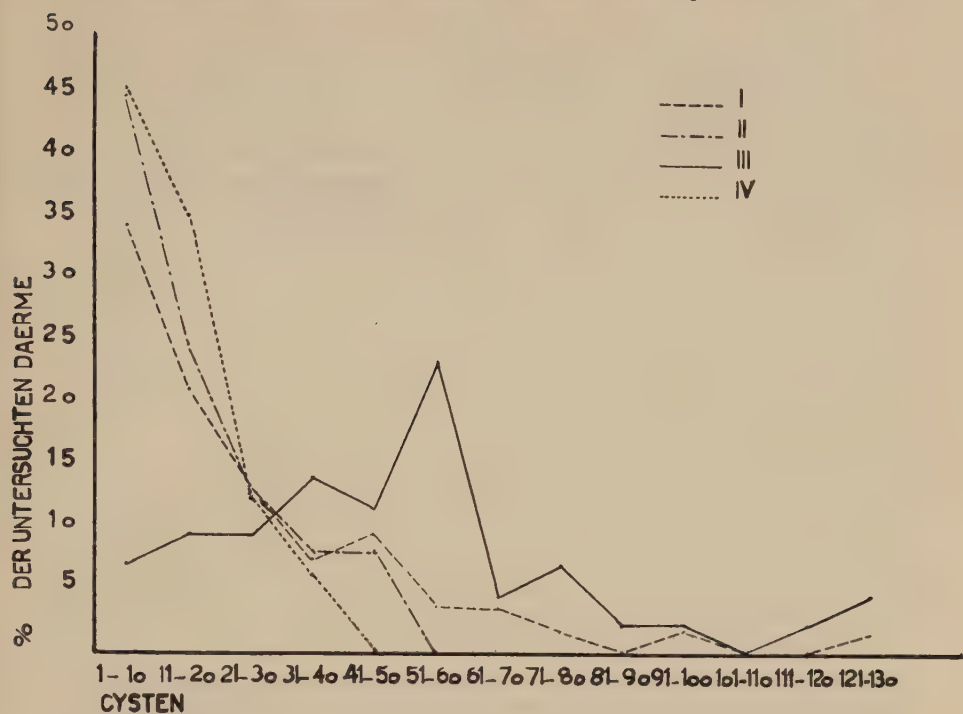


Abb. 6. Klassifikation der Därme von 4 Infektionsserien nach der Cystenzahl.

3. Diskussion der Resultate.

In diesem Kapitel geht es ausschließlich um die Wirkung der Schwerkraft, der nach HUFF und SHUTE bei Anophelen die ungleiche Cystenverteilung zuzuschreiben ist, ohne vorerst die PM zu berücksichtigen.

Auf Grund der bei zahlreichen Autopsien und Schnitten gewonnenen Einsicht können wir SHUTE's Beobachtungen an *Aedes aegypti* bestätigen. Im Gegensatz zu Anophelen tritt hier keine Trennung in Erythrocyten und Serum auf, sondern das Blut coaguliert augenblicklich nach der Aufnahme und füllt den Magen mit einem homogenen Blutkuchen. Somit wäre, wie auch SHUTE vermutet, eine gleichmäßige Cystenverteilung zu erwarten. Graphisch dargestellt ergibt die Verteilung in unseren Versuchen folgendes Bild (siehe Abb. 7):

Die Verteilungskurven weichen bei den drei verschiedenen Lagen der Mückenkurven nur unwesentlich voneinander ab. Das Cystenmaximum liegt immer in der Mitte des Magens in den Abschnitten IV oder V, während die kleinsten Zahlen in I und VIII zu finden sind. Dies überrascht nicht, wenn man bedenkt, daß der

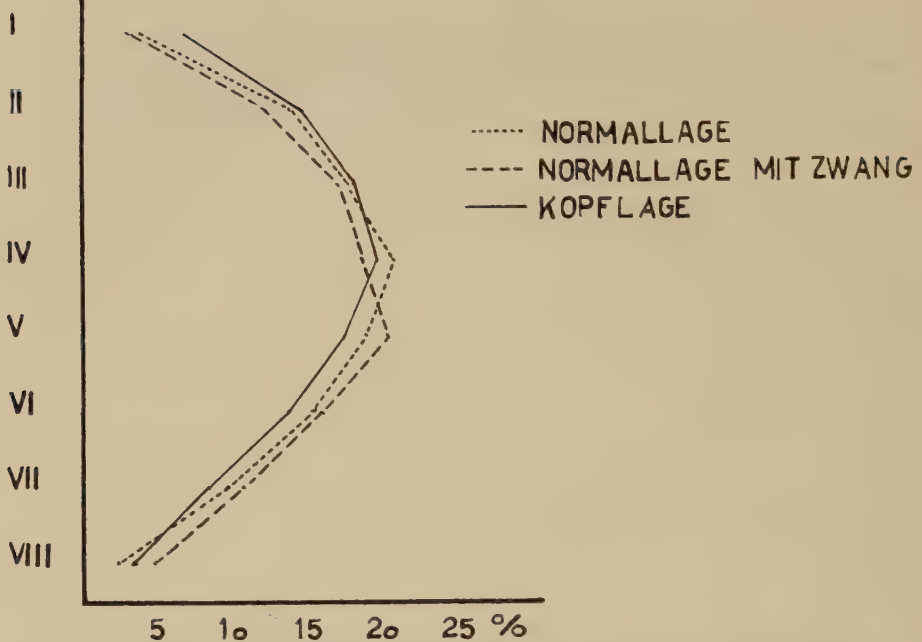


Abb. 7. Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Oocysten auf dem in 8 Abschnitten aufgeteilten Magen von *Aedes aegypti*.

Magen, seiner ovoiden Form wegen, in der Mitte das größte Volumen an Blut und damit auch am meisten Gametocyten enthält und den Ookineten die größte Fläche zur Cystenbildung bietet.

Aus diesen Ergebnissen können wir schließen, daß das unterschiedliche Verhalten des Blutes im Magen von *A. maculipennis* und *Aedes aegypti* tatsächlich für die spätere Cystenverteilung verantwortlich ist. Bei *Anopheles* sinken die schwereren Blutelemente und damit auch die aufgenommenen Gametocyten durch die Wirkung der Schwerkraft im Magen nach hinten ab, während bei *Aedes* die homogene Verteilung erhalten bleibt. Auf der Wanderung zur Darmwand liegt also der Ausgangspunkt der Ookineten im ersten Falle je nach Lage am einen oder andern Magenende, während sie bei *Aedes* von jedem beliebigen Punkt im Mageninhalt aus möglich ist.

Ist also bei *Aedes* die Schwerkraftswirkung in der Bildungsphase der Zygoten bedeutungslos, so übt sie aber vermutlich auf die der Darmwand zustrebenden Ookineten einen gewissen Einfluß aus. Addiert man nämlich jeweils die Zahlen der Abschnitte I bis IV und V bis VIII, so zeigt es sich, daß je nach Stellung der Mücke stets in der nach unten zu gelegenen Magenhälfte ein höherer Prozentsatz von Cysten verzeichnet wird.

TABELLE 8.

Prozentuale Cystenverteilung auf vordere und hintere Magenhälfte.

Lage des Darmes während der 3 ersten Infektionstage	Anteil Cysten auf der vordern Magenhälfte	Anteil Cysten auf der hintern Magenhälfte
Normallage mit Zwang Darm immer senkrecht	49,3 ⁰ / ₀	50,7 ⁰ / ₀
Normale Haltung Darm senkrecht oder waagrecht	54,6 ⁰ / ₀	45,4 ⁰ / ₀
Kopflage Darm immer invertiert	57,6 ⁰ / ₀	42,4 ⁰ / ₀

Die Zwangshaltung in Glaskapillaren wird von den Mücken schlecht ertragen und hat eine starke Mortalität zur Folge. Während bei der Normalhaltung in einem Lampenglas nur 3,3⁰/₀ der Aedes eingingen, stieg diese Zahl bei Normalstellung mit Zwang auf 49,2⁰/₀ und erreichte bei Kopflage mit 65,8⁰/₀ den höchsten Wert.

Trotzdem liegt aber dieser letztere noch unter dem von SHUTE errechneten (ca. 80%), und wir nehmen an, daß die abgeänderte Haltemethode (bessere Durchlüftung) für das günstigere Ergebnis verantwortlich ist. Dies um so mehr, als die Zeit der Zwangshaltung von 2 auf 3 Tage verlängert worden war.

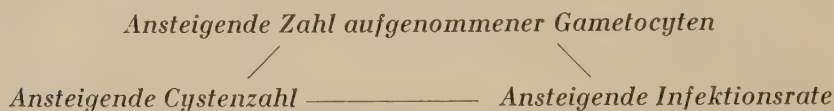
Verschiedene innere und äußere Faktoren entscheiden darüber, ob eine Mückenart zu einem guten oder schlechten Plasmodien-Überträger werden kann. Eine gute Zusammenfassung darüber findet sich bei HUFF (1941).

In unserer Arbeit gingen wir von der Cystenzahl in den infizierten Aedes aus und versuchten, daraus Schlüsse zu ziehen auf die Potenz der Gametocyten, sich in den einzelnen Mücken bis zur Cyste zu entwickeln. Eigentlich wäre zu erwarten, daß eine Gruppe von Aedes, die auf demselben Gametocytenträger zur Blutaufnahme geschritten war und die gleiche Menge infizierten Blutes aufgenommen hatte, einen mehr oder weniger gleich großen Cystenbefall zeigen würde. Wie aus Abb 6 hervorgeht, ist das aber nicht der Fall. Während sich bei 2 Serien die Verschiedenheiten in der Zahl in relativ engen Grenzen halten, liegen sie bei den beiden andern sehr weit auseinander (vgl. Tab. 7).

Es zeigt sich aber auch, daß die Höhe der Infektionsrate nicht in Zusammenhang gebracht werden kann mit den Cystenzahlen. Obschon z. B. die Kurven von Serie II und IV ähnlich verlaufen, liegen die entsprechenden Infektionsraten weit auseinander.

Nach SHAH, ROZEBOOM & DEL ROSARIO (1934) ist die Infektionsrate der Mücken abhängig von der Zahl der aufgenommenen Gametocyten. Werden also bei einer Blutmahlzeit wenig Geschlechtsformen aufgenommen, so infiziert sich ein kleiner Prozentsatz der Mücken, gelangen dagegen mehr zur Aufnahme, so steigt der Anteil der infizierten und erreicht schließlich 100%.

An diese Folgerungen anknüpfend, kamen LUMSDEN & BERTRAM (1940) auf Grund von Versuchen zum Schlusse, daß eine hohe Cystenzahl (Durchschnittszahl) gleichbedeutend sei mit der Aufnahme zahlreicher Gametocyten. Aus diesen Arbeiten lassen sich also folgende Zusammenhänge herauslesen:



Diese Beziehungen (siehe auch EYLES 1951) scheinen logisch zu sein. Nun konnten aber, wie bereits erwähnt, HUFF & MARCH-BANK (1954) zeigen, daß die Kurven für Gametocyten- und Cystenzahl nicht parallel verlaufen. Bevor die Geschlechtsformen ihr Maximum erreichen, fällt die Cystenzahl ab.

Auch unsere Resultate fügen sich nur bedingt in obiges Schema ein. Uns beschäftigte vor allem die Frage nach dem Schicksal der ausgebildeten Ookineten. Wenn in der einen Mücke nach der infektiösen Blutmahlzeit 127 Cysten gezählt werden können, während in einer andern, gleichzeitig gefütterten, nur 2 aufzufinden sind, so erhebt sich die Frage, welcher Faktor diese Verschiedenheiten verursachen könne, da doch anzunehmen ist, daß anfänglich ungefähr die gleiche Ookinetenzahl die Wanderung zur Darmwand angetreten hat. Um dabei die Möglichkeit der Aufnahme ungleicher Blutmengen ausschließen zu können, waren für die Versuche nur ganz vollgesogene Mücken verwendet worden.

Diese Frage soll im nächsten Kapitel weiter abgeklärt werden.

IV. Studium des Penetrationsvorganges der Ookineten.

1. Bildungszeit und Anwesenheit der Ookineten im Mückendarm.

Um den Zeitpunkt des ersten Auftretens und die Dauer der Anwesenheit der Ookineten im Magen festzustellen, wurden zahlreiche Ausstriche des Darminhaltes infizierter *Aedes* angefertigt. Die Angaben über die dabei verwendete Technik finden sich bei GEIGY & HERBIG (1955 S. 122). Alle Präparate wurden mit Giemsa (Romanowsky) gefärbt.

TABELLE 9.

Vorkommen der Ookineten auf Darmausstrichen.

Stunden nach Blutmahlzeit	Zahl der Ausstriche	Zahl der aufgefundenen Ookineten
16	1	80
18	2	19, +
22	2	11, +
22½	2	44, 213
23	4	12, 18, 13, 8
27½	4	44, 26, +, +
30	3	89, 32, +
48	1	18

+ = vorhanden, aber nicht gezählt.

Da diese Untersuchungen lediglich dazu dienten, den möglichen Zeitpunkt der Ookinetenpenetration in das Darmepithel zu ermitteln, wurden nur Stichproben gemacht in Abständen verschiedener Stunden nach der Blutmahlzeit. Im übrigen ist es nicht möglich, auf diese Weise exakte Ookinetenzählungen durchzuführen, da bei der Sektion und bei der Anfertigung der Ausstriche stets Teile des Darminhaltes verlorengehen, somit nie alle Zygoten erfaßt werden können.

In je 2 Ausstrichen nach 4, 8, 10, 12 und 14 Stunden konnten noch keine Ookineten festgestellt werden, sie erschienen erstmals nach 14 Stunden. In Tab. 9 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß die Ookineten, die sich zwischen der 14. und 16. Stunde bilden, während einer langen Periode im Darminhalt aufzufinden sind und nicht, wie man erwarten könnte, gesamthaft daraus verschwinden, um ihre Weiterentwicklung zur Oocyste im Darmepithel durchzumachen. Zur Abklärung der weiteren Vorgänge mußten deshalb Schnitte angefertigt werden.

2. Auszählung der Ookineten auf Schnitten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der infektiösen Blutmahlzeit.

Die Auswertung der Schnittpräparate erfolgte in verschiedenem Sinne. Einmal wollten wir den Weg der Ookineten vom Bildungs-ort bis in die Darmwand verfolgen und dabei feststellen, wie und wo die PM passiert wird, und wie das Eindringen in das Epithel vor sich geht. Andererseits sollte hier, da dies auf Ausstrichen nicht möglich war, der zeitliche Ablauf der Ookinetenwanderung und

der Cystenbildung festgelegt werden. Zugleich bot sich Gelegenheit, die Lage der auf der Wanderung befindlichen Ookineten innerhalb des Magens festzustellen und zahlenmäßig zu erfassen.

Technik: Die besten Ergebnisse wurden mit Carnoy-Fixierung (1 Std.) und Haematoxylin-Heidenhain-Färbung erzielt. Eine Schwierigkeit bestand darin, daß die Därme und ganz besonders das eingeschlossene Blut hart und brüchig wurden und schlecht zu schneiden waren. Dies ließ sich vermeiden, wenn die Einbettung über Butylalkohol erfolgte. Die Schnittdicke betrug immer $5\ \mu$. Während des langen Färbeprozesses erwies es sich als unumgänglich, die Schnitte mit einem dünnen Celloidinfilm festzuhalten.

Wie schon auf Ausstrichen, so war auch in den Schnittpräparaten eine genaue quantitative Erfassung der Ookineten unmöglich. Der Kern der Hühnchenerythrocyten wird durch Haematoxylin dunkel gefärbt. Bei der Schnittdicke von $5\ \mu$ zeigte nun der Blutkuchen eine so dichte schwarze Färbung, daß die darin liegenden Ookineten nicht mehr sichtbar waren. Erst wenn sich bei fortschreitender Verdauung die Erythrocyten von der Peripherie her auflösten, wurden die ebenfalls dunkel gefärbten Ookineten erkennbar.

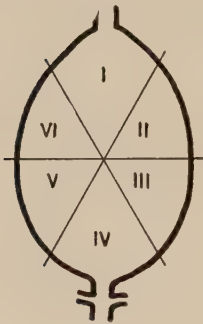


Abb. 8. Einteilung der Darmschnitte zur Lokalisation der Ookineten.

Um nun die Verteilung der Ookineten im Darmlumen festzuhalten, wurde eine besondere Methode entwickelt. Wir dachten uns den Magen aufgeteilt in 6 Sektoren (siehe Abb. 8). Die Sektorengrenzen, die natürlich nicht im Präparat markiert werden konnten, wurden visuell in jeden einzelnen Schnitt hineinprojiziert und nach Merkpunkten im Epithel fixiert. Die Lage jedes Ookineten wurde notiert. Diese Methode ist zwar nicht sehr exakt, genügte aber den gestellten Anforderungen.

Ergebnisse: Die Resultate der Ookinetenzählungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Blutmahlzeit werden in Tabellenform gegeben. Gleichzeitig sind auch die auf der Darmwand liegenden Oocysten vermerkt.

Die oben beschriebene Methode diente nun zweierlei Zwecken. Einerseits der Lokalisierung der Ookineten, andererseits der Prüfung, ob die penetrationsbereiten Ookineten nach ihrer Lage im Darmlumen der Verteilung der Cysten, wie sie auf der Darmwand beobachtet wird, entsprechen. Einige herausgegriffene Beispiele sollen die Auszählungen zwecks Lokalisierung illustrieren (Abb. 9).

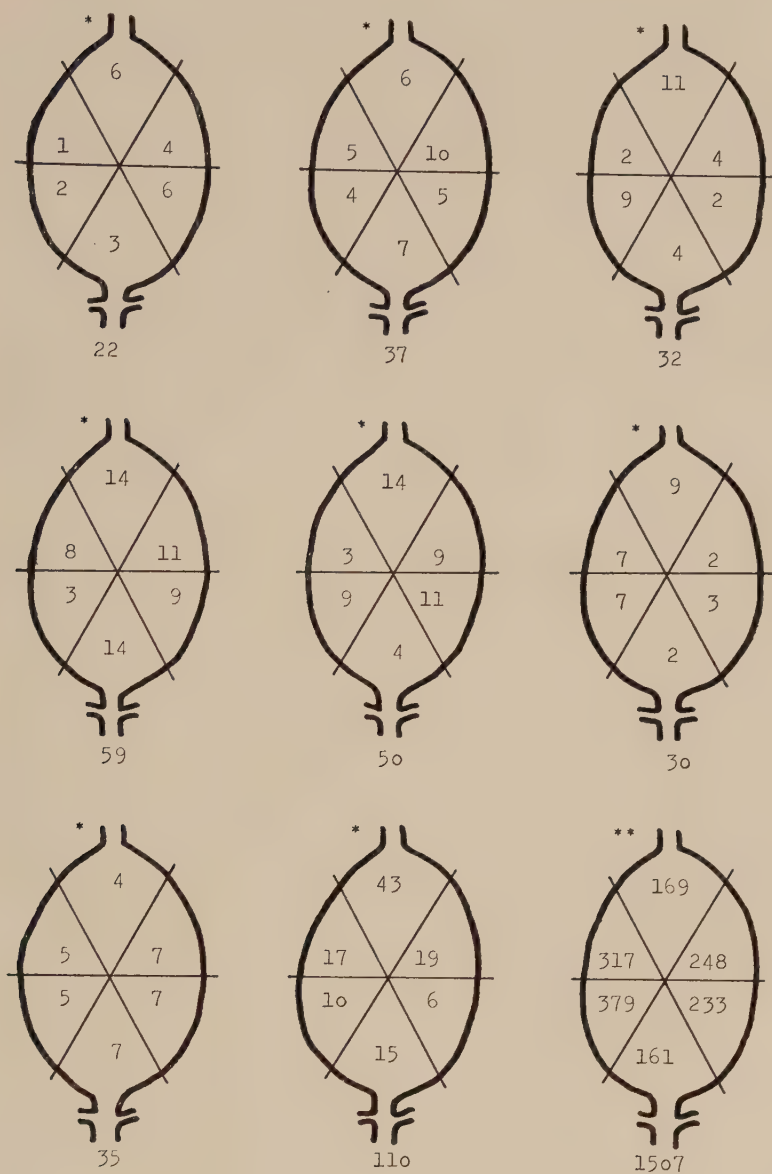


Abb. 9. Beispiele zur Darstellung der Lokalisierung penetrationsbereiter Ookineten im Darmlumen.

Die auf demselben Gametocytenträger gefütterten Mücken sind mit der gleichen Sternzahl markiert.

TABELLE 10.

Stunden nach Blutmahlzeit	Untersuchte Därme	Davon mit Parasiten	Ookineten	Oocysten
22	3	2	58, 14	—, —
23	3	3	36, 30, 4	—, —, —
24	3	2	7, 2	+, —
27	8	6	52, 15, 1, 6, 1, 6	—, +, —, —, —, —
28	2	2	21, 1514	+, +
29	3	3	35, 17, 2	+, +, —
31	5	5	15, 32, 61, 35, 3	—, +, +, +, —
41	5	5	28, 22, 37, 616, 8	—, +, +, +, —
43	5	5	41, 90, 42, 48, 166	+, +, +, +, +
46	1	1	183	+
48	1	1	196	+
63	3	3	3, —, —	+, +, +
65	4	3	} alle —	} alle +
70	6	6		
75	3	2		
80	6	6		
85	3	1		
90	6	4		
95	7	6		

3. Zeitlicher Ablauf der Ookinetenwanderung vom Lumen bis auf die Darmaußenseite.

Die gleichen Ausstrich- und Schnittpräparate, die uns vorher das Zahlenmaterial geliefert und Lagebestimmungen erlaubt hatten, ermöglichten nun auch, den zeitlichen Ablauf der Ookinetenwanderung zu verfolgen. Da diese Vorgänge temperaturabhängig sind, ist festzuhalten, daß alle Versuchsmücken bei einer konstanten Temperatur von 26° C gehalten worden waren. Die Zeitangaben beziehen sich immer auf die Spanne, die seit der Aufnahme der infektiösen Blutmahlzeit verflossen war.

Die anfänglich runden Zygoten, die aus der Vereinigung von Mikro- und Makrogameten resultieren, treten erst nach 16 Stunden als mobile Ookineten auf. Wir müssen annehmen, daß sie zu diesem Zeitpunkt im ganzen Darminhalt verstreut liegen. Nun setzt die Wanderungsbewegung ein, und 6 Stunden später, wenn der Verdauungsgrad des Blutes Beobachtungen im Schnittpräparat zuläßt, können sie in größerer Zahl an der Peripherie des Blutkuchens, in unmittelbarer Nähe der PM beobachtet werden. Der Durchtritt durch die Membran erfolgt nun nicht massenweise, sondern erstreckt sich, entsprechend der zeitlich gestaffelten Bildung der Ookineten und damit auch ihres successiven Eintreffens an der PM, über eine gewisse Zeit. Zwischen der 22. und 30. Stunde kön-

nen stets Exemplare im extraperitrophischen Raum aufgefunden werden. Eine außerordentliche Seltenheit ist es, Ookineten in dem Augenblick zu finden, wo sie sich eben durch die Membran durcharbeiten (Abb. 10—12). Doch ist aus der Lage der bereits durchgetretenen abzulesen, daß dies an jeder beliebigen Stelle möglich ist.

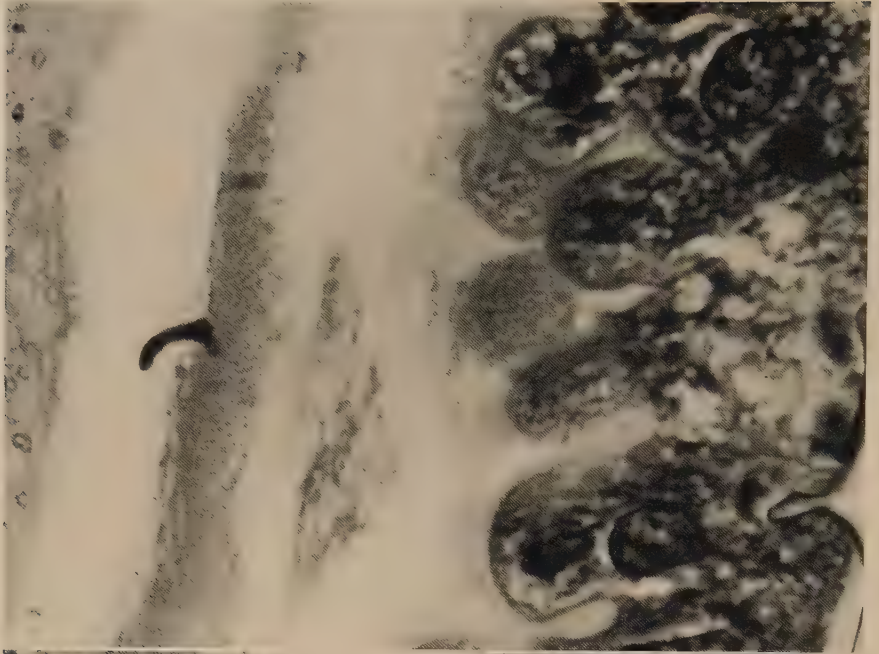
Während die bisherigen Vorwärtsbewegungen senkrecht zur Darmwand ausgeführt worden sind (Abb. 13), legen sich die Ookineten jetzt parallel dem Stäbchensaum an (Abb. 14, 15). In der nächsten Phase ihrer Wanderung findet man die Zygoten, bereits wieder abgerundet, unter dem Stäbchensaum (Abb. 16). Während sie bisher auch bei ungünstiger Intensität der Färbung an ihrer halbmondförmigen Gestalt leicht erkenntlich waren, können sie jetzt einzig durch die vom Makrogametocyten stammende Pigmentgranula von den oft gleich großen Zellelementen des Epithels unterschieden werden. Im weitem Verlauf des Penetrationsprozesses finden sie sich zwischen den Epithelzellen, immer näher an die Darmaußenseite rückend, bis sie endlich als junge Oocysten unter die Basalmembran, die Tunica elastico-muscularis von GRASSI zu liegen kommen, diese abheben und unter Kernvermehrung und Größenzunahme heranwachsen (Abb. 17, 18).

Entsprechend dem zeitlich abgestuften Eintreffen der Ookineten an der Darmwand, können die ersten jungen Cysten nach 24 Stunden entdeckt werden, und bis etwa zur 32. Stunde findet man Zygoten auf allen möglichen Stufen der Epithelpenetration. Nach diesem Zeitpunkt können nur noch Cysten und innerhalb der PM liegende Ookineten festgestellt werden. Diese liegen zum Teil sehr zahlreich parallel an der Membran und sind offenbar nicht mehr in der Lage, dieses nunmehr erhärtete Gebilde zu durchdringen (Abb. 19). In Übereinstimmung mit HUFF (1934) konnten wir nämlich feststellen, daß sie von der 30. Stunde an Degenerationserscheinungen zeigen. Sie verlieren ihre scharfen Konturen, und der Kern beginnt zu zerfallen. In Ausstrichen waren diese Erscheinungen besonders deutlich zu beobachten. Solche degenerierende Ookineten bleiben aber auch weiterhin erkennbar, bis über 63 Stunden hinaus, d. h. so lange der Aedesmagen noch Reste der Blutmahlzeit enthält.

4. Diskussion der Resultate.

In diesem Kapitel konnten alle Phasen der Ookinetenwanderung verfolgt werden. Da die Rolle der PM im Verlaufe der Malariainfektion der Mücken die Kernfrage unserer Arbeit bildete, wurde ihrer Perforation durch die Ookineten besondere Beach-

10



11

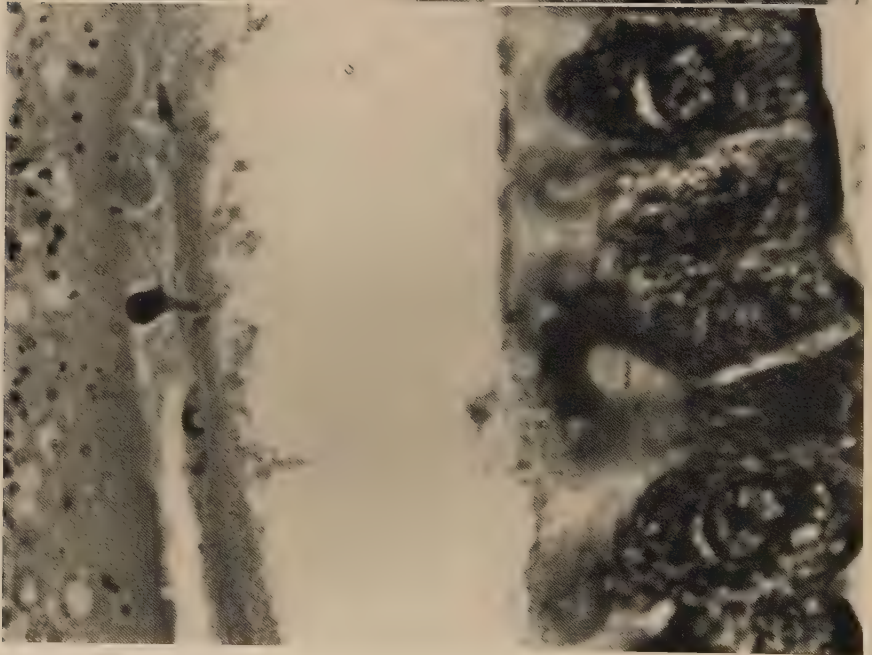
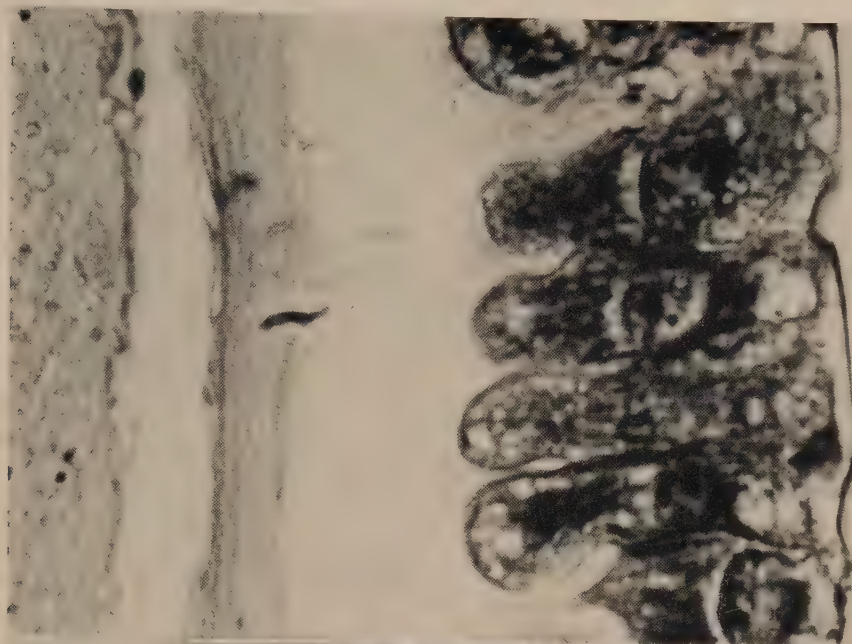
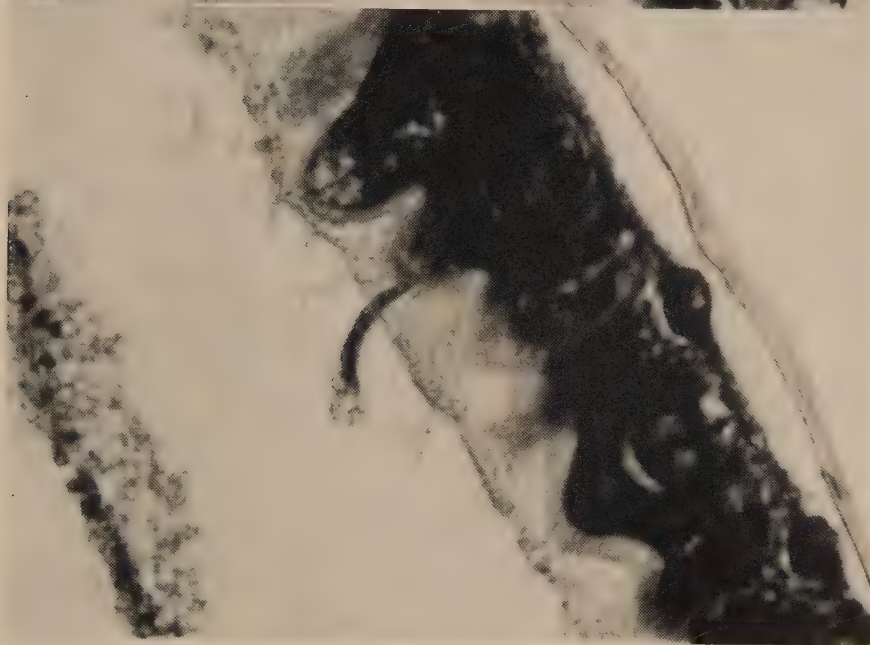


Abb. 10. Ookinet, mit der Spitze in die PM eindringend (Vergr. ca. 1360 $\times$).
 Abb. 11. Ookinet, mit der Spitze in der PM steckend. Das Hinterende ist abgerundet.
 Zwei weitere liegen parallel an der PM (Vergr. ca. 1360 $\times$).



12



13

Abb. 12. Ookinete, kurz vor Beendigung der Perforation der PM (Vergr. ca. 1360 $\times$).

Abb. 13. Ookinete im extraperitrophischen Raum. Dringt gegen Epithel vor. Über dem Stäbchensaum liegt eine Schicht von Verdauungsprodukten (Vergr. ca. 1360 $\times$).

14



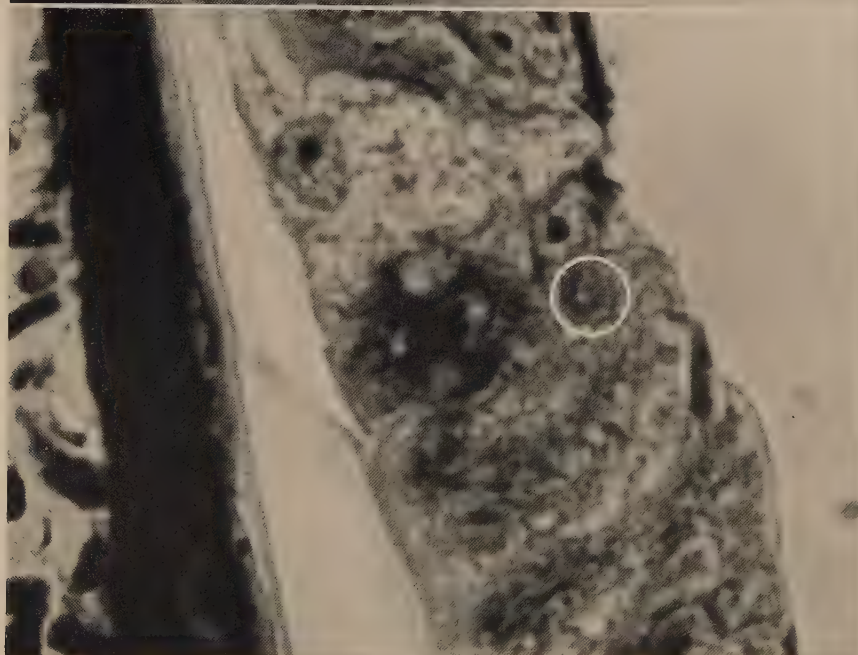
15



Abb. 14. Ookinet legt sich parallel zum Epithel. Links PM (Vergr. ca. 1360 $\times$).
Abb. 15. Ookinet im Stäbchensaum kurz vor dem Eindringen ins Epithel. Links PM
(Vergr. ca. 1360 $\times$).



16

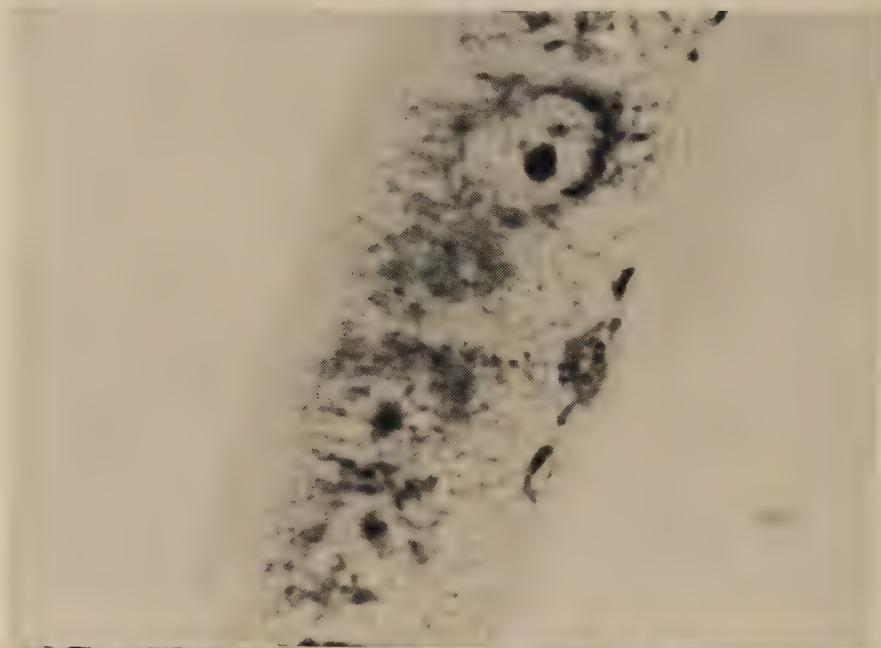


17

Abb. 16. Abgerundeter Ookinet in der ersten Phase der Penetration. Pigment als dunkle Punkte sichtbar. Links stark gefärbter Darminhalt (Vergr. ca. 1360 $\times$).

Abb. 17. Abgerundeter Ookinet nahe der Darmaußenseite. Links PM sichtbar (Vergr. ca. 1360 $\times$).

18



19

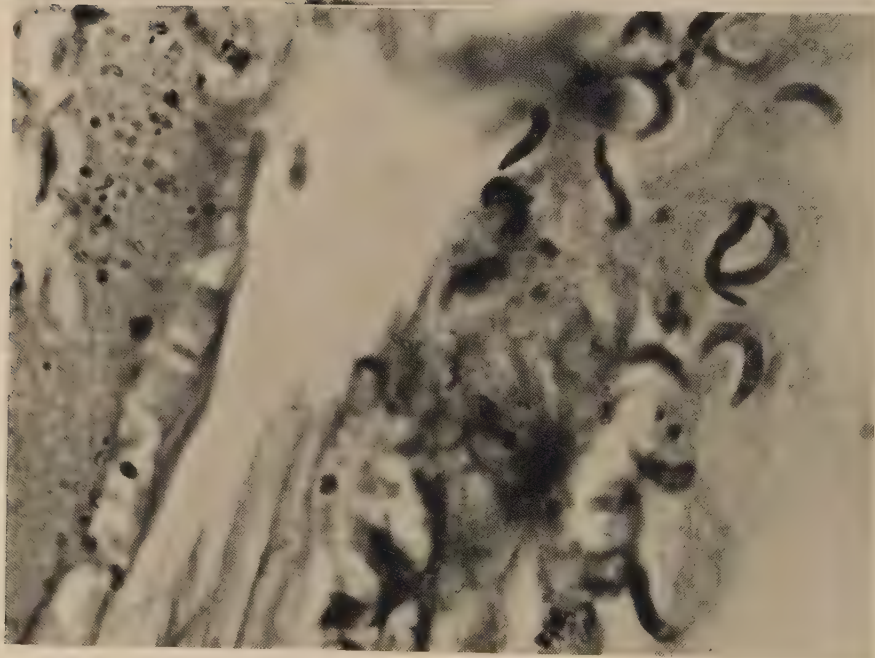


Abb. 18. Die Penetration ist beendet. Ganz junge Cyste unter der Basalmembran (Vergr. ca. 1360 $\times$).

Abb. 19. Innerhalb der PM eingeschlossene Ookineten. Die PM ist im Schnitt flach getroffen (Vergr. ca. 1360 $\times$).

tung geschenkt. Wir stellten fest, daß dieser Vorgang zeitlich begrenzt ist und ungefähr zwischen der 20. und 30. Stunde nach der infektiösen Blutmahlzeit abläuft. Ookineten, die nach dieser Zeit noch in der PM eingeschlossen sind, gehen zugrunde.

Aus der Häufigkeit, mit der die Ookineten im Mageninhalt in unmittelbarer Nähe der PM aufgefunden werden, kann man schließen, daß sie ihnen einen gewissen Widerstand bietet. Diese Beobachtung ist nicht erstmalig, sondern wurde auch schon von GRASSI (1901) und REICHENOW (1932) gemacht. Viel seltener finden sie sich dagegen nach dem Durchtritt durch die Membran im extraperitrophischen Raum. Das Eindringen in das Epithel scheint also im Gegensatz dazu keine besonderen Schwierigkeiten zu bereiten und dürfte sich ziemlich rasch abwickeln.

Das Eindringen der Ookineten in das Magenepithel erfolgt nach unseren Beobachtungen, im Gegensatz zu den in den meisten Lehrbüchern gegebenen Darstellungen, jedenfalls nicht durch mechanisches Einbohren. Alle an der Darmwand befindlichen Zygoten waren nicht mit ihrer Spitze gegen sie gerichtet, sondern lagen parallel dazu. Bald darauf befanden sie sich bereits abgerundet im Epithel. Ähnliche Beobachtungen machte auch HUFF (1934).

Unklarheit herrscht darüber, ob die Malariaookineten zwischen den Zellen des Epithels durchwandern oder ob sie in die Zellen selbst eindringen. Alle unsere Beobachtungen weisen darauf hin, daß der Durchtritt zwischen den Zellen erfolgt (s. Abb. 20). In welcher Weise das Eindringen ins Epithel und die Vorwärtsbewegung des nun abgerundeten Ookineten zwischen den Zellen zustande kommt, ging allerdings nicht aus den Präparaten hervor. HUFF (1934) arbeitete mit *Culex pipiens*, *Plasmodium cathemerium* und *Pl. relictum* und führte die Penetration auf das allmähliche Größenwachstum der Ookineten zurück, die dadurch die Epithelzellen auseinanderdrängen und schließlich auf die Außenseite zu liegen kommen. Dieser Interpretation können wir uns aber nicht anschließen, da wir erst an der jungen, unter der Basalmembran liegenden Oocyste eine Größenzunahme beobachten konnten. Es

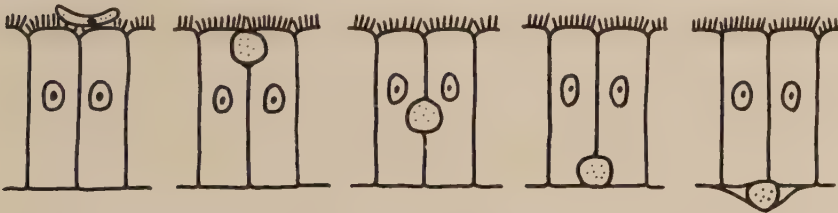


Abb. 20. Schema zur Darstellung des Durchtritts des Ookineten durch das Magenepithel.

wäre denkbar, daß die Penetration durch Sekretausscheidung des Parasiten unterstützt würde.

Wie aus den in Abb. 9 dargestellten Beispielen, die sich beliebig vermehren lassen, hervorgeht, erwies es sich, daß die penetrationsbereiten Ookineten nach ihrer Lage im Darmlumen der spätern, gleichmäßigen Cystenverteilung auf dem Darm entsprechen. Wohl bestehen zwischen den einzelnen Sektoren Unterschiede, denen aber keine Bedeutung zugemessen werden kann, da auch bei den Cysten von Individuum zu Individuum Verschiedenheiten in bezug auf die Verteilung auftreten und erst aus Durchschnittswerten die allgemeine Verteilungstendenz herausgelesen werden kann. Unsere früher gezogenen Schlüsse sind damit bestätigt (S. 326).

V. Zusammenhänge zwischen Infektionsverlauf und Beschaffenheit der peritrophischen Membran.

Es ist schon eingangs erwogen worden, ob nicht die ungleiche Cystenverteilung auf dem Anophelesdarm zurückgeführt werden könnte auf die PM, die sich den Ookineten in den Weg stellen würde. Daß diese Möglichkeit durchaus ins Auge zu fassen war, zeigte sich am Fall der verschiedenen Trypanosomen-Zyklen in der Tsetsefliege (siehe GEIGY & HERBIG 1955, S. 229—31) und an andern Beispielen.

Anfänglich erwarteten wir bei der Imago von *Aedes aegypti* eine PM vom selben Typ II, wie er für ihre Larve bekannt war. Die seitdem gewonnenen Erkenntnisse ergeben jedoch ein wesentlich anderes Bild.

Die PM, die jedesmal im Anschluß an eine Blutmahlzeit vom Mitteldarmepithel neu sezerniert wird und sich allmählich verfestigt, umhüllt den Mageninhalt als vollkommen geschlossenes Säckchen. Die Ookineten, die in der Folge überall im Blutkuchen verteilt entstehen, streben der Darmwand zu und stoßen im Verlaufe ihrer Wanderung auf die PM. Sie ist beim Eintreffen der ersten Parasiten noch weich und wird von ihnen mühelos passiert. Mit zunehmender Verfestigung bietet sie den Ookineten aber wachsenden Widerstand, und eine geringer werdende Zahl derselben vermag durchzudringen. Schließlich wird die Perforation unmöglich und alle noch im Lumen befindlichen Ookineten werden dort, meist dicht der Membran angelagert, zurückgehalten und gehen zugrunde. Dieser Tatbestand ist graphisch noch einmal in Abb. 21 dargestellt.

Wenn vielleicht auch der Schlußfolgerung, daß die Veränderungen der PM eine zunehmende Behinderung der penetrations-

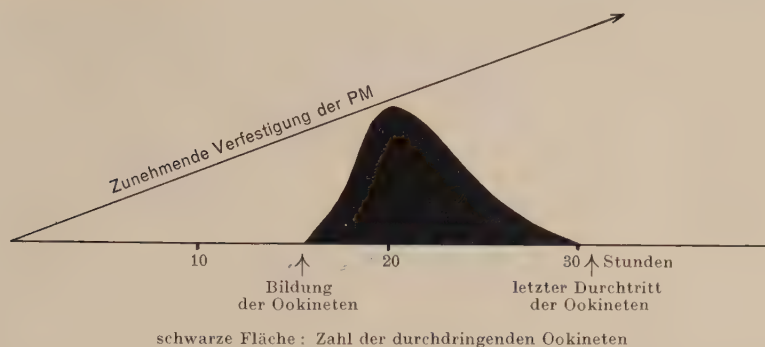


Abb. 21. Schema zur Darstellung des Zusammenhanges zwischen Verfestigung der PM und Durchtritt der Ookineten.

bereiten Ookineten im Gefolge haben, bis zu einem gewissen Grad eine subjektive Beurteilung zugrunde liegt, so sprechen doch auch noch andere Beobachtungen für diese Annahme.

Auf Ausstrichen des Mageninhaltes konnten auch nach der 20. Stunde noch Zygoten festgestellt werden, die sich im Übergangsstadium von der runden zur langgestreckten, beweglichen Form befanden. Diese Beobachtung und die Erwägung, daß die Ookineten je nach Entstehungsort im Darmlumen längere oder kürzere Strecken bis zur Peripherie zurückzulegen haben, erklären zur Genüge, daß sie in beträchtlichen zeitlichen Abständen an der PM eintreffen können und je später dies geschieht, hier desto stärker veränderte Verhältnisse antreffen müssen.

Auch wenn eine quantitativ genaue Erfassung der Ookinetenzahl im Mückendarm unmöglich war und die tatsächlichen Werte noch bedeutend höher liegen dürften, so ergibt sich doch aus einzelnen unserer Erhebungen ein sicherer Hinweis, daß bei weitem nicht alle Zygoten zur Weiterentwicklung kommen. Während wir auf Ausstrichen und in Schnittserien Zahlen von 166, 183, 196, 203, 616 und 1507 pro Mücke feststellen konnten, lag andererseits unser Cystenmaximum bei 127. Obschon bei der Infektion bei *Aedes aegypti* und *Pl. gallinaceum* auch schon bedeutend mehr Cysten gezählt worden sind (z. B. BRUMPT 1936: 1650 Stück und EYLES 1951 bis ca. 300), so sind dies doch Ausnahmefälle, die die normalen Durchschnittszahlen bei weitem übertreffen.

Schließlich legt auch die Tatsache, daß nach einer gewissen Zeit, wenn die unter der Basalmembran liegenden jungen Cysten bereits zur Weiterentwicklung schreiten, noch immer zahlreiche Ookineten innerhalb der PM liegen, Zeugnis dafür ab, daß ihnen jeder weitere Durchtritt verwehrt bleibt.

Wie auch in der Diskussion zu Kapitel III erwähnt, ist schon verschiedentlich nach Faktoren gesucht worden, die den Verlauf der Malariainfektion in der Mücke hemmend beeinflussen könnten, denn es ist ja schon lange bekannt, daß die Übertragungsfähigkeit der verschiedenen Stechmückenarten stark variiert von gut bis schlecht, ja daß zahlreiche Arten überhaupt nicht übertragen. Interessant hiezu ist auch die Feststellung von HUFF (1927), wonach die Ookinetenbildung auch im Darm von nicht übertragenden Mückenarten vor sich gehen kann. Was aber der Weiterentwicklung im Wege steht, konnte nicht abgeklärt werden. Verschiedenheiten des Magenepithels dürften nicht dafür verantwortlich sein, da vergeblich danach geforscht wurde (HUFF 1934 und PAL 1943).

Vieles weist nun darauf hin, daß in der PM ein wichtiger Faktor gefunden ist, der diese Unterschiede der Infektibilität bei Mücken verständlich machen könnte. Jedenfalls konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die PM für eine Hemmung eines guten Teils der Ookineten verantwortlich ist, und daß sie auch bei gleichzeitig und auf demselben Gametocytenträger infizierten Mücken Gruppen individuelle Differenzen der Cystenzahlen verursachen kann (vgl. Abb. 6).

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, sind auch andere Fälle bekanntgeworden, wo Zusammenhänge zwischen Erregercyclus und Struktur der PM im Arthropodenwirt bestehen, und wir möchten besonders auf die Verhältnisse bei *Simulium* und *Onchocerca* (LEWIS 1953) hinweisen, wo die Membran ebenfalls einen Teil der Parasiten einschließt und an der Weiterentwicklung hindert.

Was hier für *Aedes aegypti* dargelegt wurde, dürfte auch für andere Culiciden-Arten gelten. Unterschiede in den Membranverhältnissen könnten vielleicht manche Fälle verschiedener Übertragungsfähigkeit erklären, wenn dies zweifellos auch nicht der einzige maßgebende Faktor ist.

VI. Kernvorgänge bei der Cystenentwicklung.

Seit den klassischen Veröffentlichungen von GRASSI (1901) und SCHAUDINN (1902) ist der Sporogonie-Cyclus der Malariaparasiten in der Mücke am Beispiel von *Plasmodium vivax* mehr oder weniger bekannt. Allerdings harren noch einige Punkte der weiteren Abklärung, so besonders das Problem der Feinstruktur des Kernes, der Kernteilungsvorgänge bei der Sporozoitendifferenzierung und der Reduktionsteilung im Verlaufe der Gametogenese. Verschiedene Autoren haben sich mit diesen Fragen beschäftigt; für eine Übersicht über die bisherigen Forschungsergebnisse sei auf die

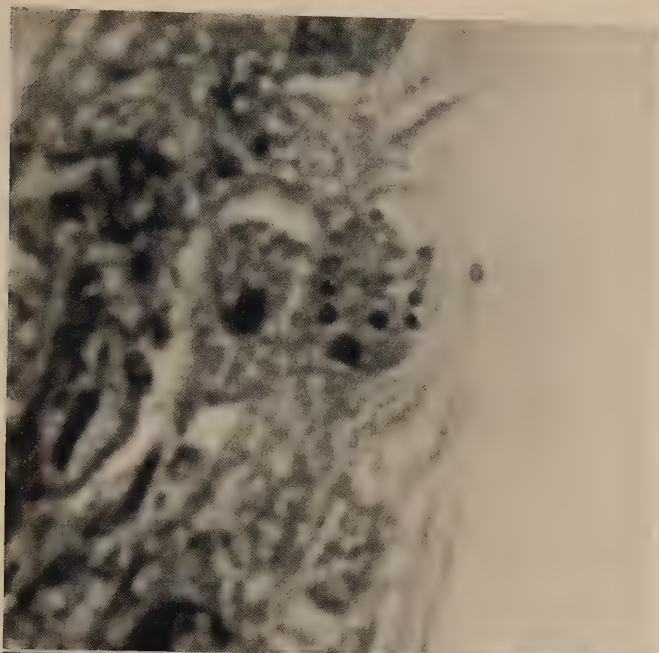


Abb. 22.

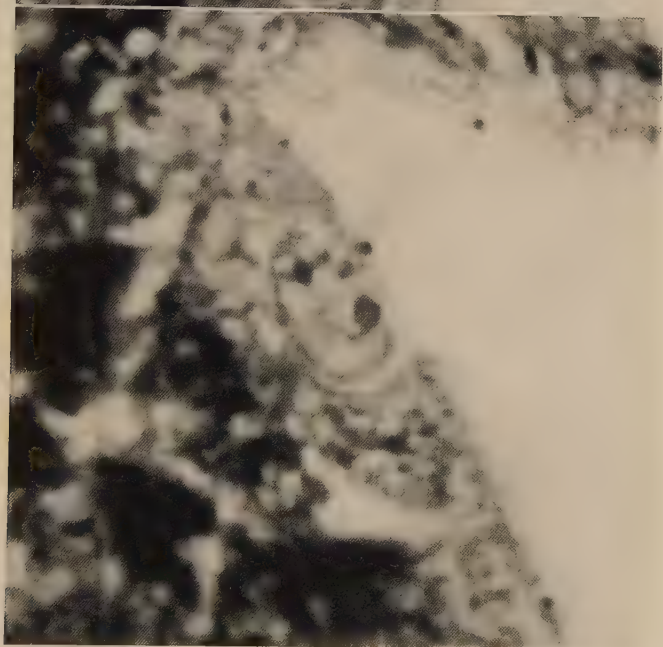


Abb. 23.

Abb. 22. Junge, einkernige Cyste mit Pigmentgranula (Vergr. ca. 2720 $\times$). In den beigefügten erläuternden Skizzen sind die großen und kleinen Kerne vollschwarz, die Pigmentgranula schwarz konturiert eingezeichnet.

Abb. 23. Zweikernige Cyste (Vergr. ca. 2720 $\times$).



Abb. 24.

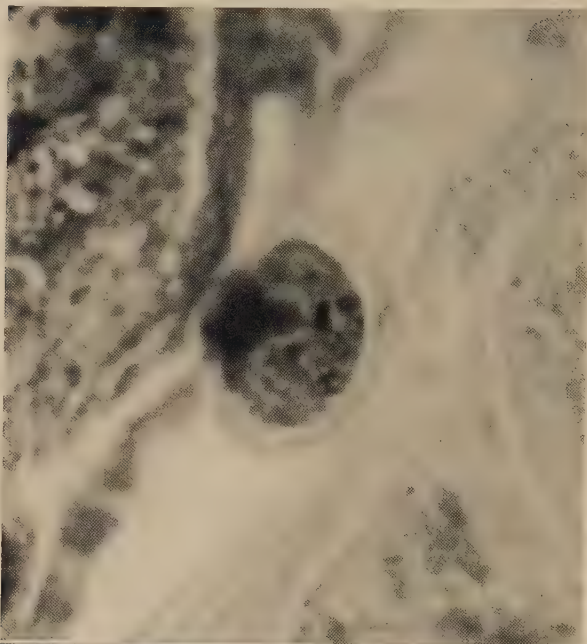
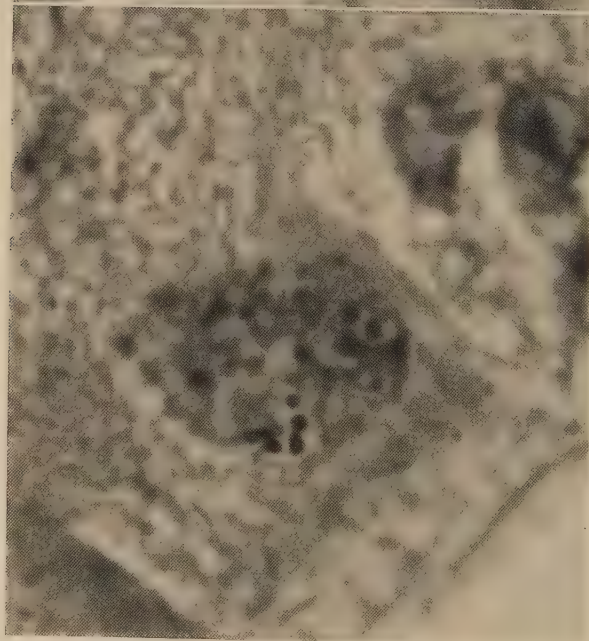


Abb. 25.

Abb. 24. Mehrkernige Cyste (1 + 4) (Vergr. ca. 2720 $\times$).Abb. 25. 32kernige Cyste. Nur ein Bruchteil davon erkennbar. Die Cyste liegt scheinbar im Epithel, da die Darmwand flach angeschnitten ist (Vergr. ca. 2720 $\times$).

umfassende Darstellung im Buche von GEIGY & HERBIG (1955 S. 70 ff.) hingewiesen.

Bereits beim Planen der für die Durchführung unserer Arbeit notwendigen Arbeitsgänge war an die Möglichkeit gedacht worden, die dazu anzufertigenden Schnittpräparate gleichzeitig für die Beobachtung der ersten Schritte der Kernvorgänge bei der Cystenentwicklung auszuwerten. Es zeigte sich dann aber in der Folge, daß die Kernvermehrungsphase erst nach Beendigung des Verdauungsvorganges bei der 63. Stunde einsetzte, und die Untersuchungen mußten bis zur 95. Stunde ausgedehnt werden (siehe Tab. 10).

Der Großteil der Schnittserien (24 Därme) wurde wiederum mit Haematoxylin-Heidenhain gefärbt, während die übrigen (12 Därme) für die Durchführung der Feulgen'schen Nuklealreaktion verwendet wurden.

Bei der Durchsicht der mit Haematoxylin gefärbten Schnitte ergab es sich, daß sich längst nicht alle aufgefundenen Cysten zum Studium der Kernverhältnisse eigneten. Nur wenn nach dem Färben mit Eisenalaun nicht zu stark differenziert wurde, resultierten klare Bilder. Deshalb waren von den ca. 170 vorhandenen Cysten nur 39 auswertbar.

Wie erwähnt, erfolgte das Eintreffen der Cysten unter der Basalmembran, infolge des zeitlich gestuften Anrückens der Ookineten, nicht gleichzeitig. Dementsprechend traten auch jetzt Verschiebungen bei der Weiterentwicklung zutage, die die Deutung der Befunde erschwerten. Doch ließen sich aus der Zunahme der Kernzahlen die aufeinanderfolgenden Phasen erkennen.

Zur Darstellung der Resultate dienen mikrophotographische Aufnahmen (Abb. 22—25) mit beigegebenen kommentierenden Skizzen. Dabei ist zu bedenken, daß hier jedesmal nur eine bestimmte Schnittfläche und nicht die Cyste mit ihrem ganzen Inhalt erkennbar ist. Der tatsächliche Sachverhalt konnte nur eruiert werden auf Grund des Studiums ganzer Schnittfolgen. Daraus ergaben sich auch die Schemata (Abb. 26) bei welchen die Elimination der einen Hälfte des Zygotenkerns und die Vermehrung des übrigbleibenden Kernpartners bis zum 32-Kleinkern-Stadium wiedergegeben ist. Hier ist auf die Darstellung der Pigmentgranula verzichtet worden. Diese sind lediglich in den Mikroaufnahmen zu sehen, und man erkennt dort, daß die einzelnen Körnchen weder ihrer Zahl noch ihrer Anordnung gemäß Konstanz aufweisen.

Betrachtet man die Darstellungen von GRASSI, so erkennt man, daß sich unsere, an Haematoxylin gefärbten Schnitten erzielten Befunde weitgehend mit den seinen decken. Bei dieser Färbung erscheinen die Kerne je nach Differenzierungsgrad schwarz bis

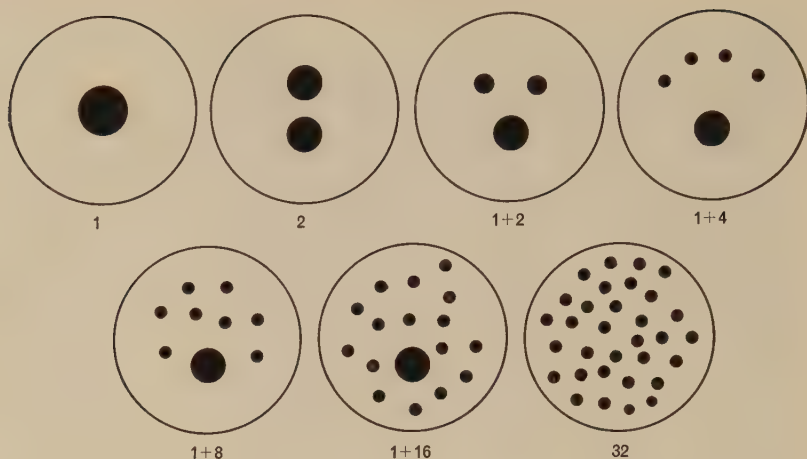


Abb. 26. Schematische Darstellung der Kernvermehrung in der jungen Cyste.

grau, die Granula sind bräunlich und auffallend lichtbrechend. Neu ist die Beobachtung, daß sich einer der beiden aus der ersten Kernteilung stammenden Kerne offenbar durch fortschreitende Teilungen vermehrt, während der andere unverändert bestehen bleibt und nach dem 16-Kern-Stadium verschwindet.

Um einen bessern Einblick in diese Vorgänge zu erhalten, wurde die Feulgen-Färbung zu Hilfe gezogen. Entgegen unsern Erwartungen fiel aber das Ergebnis in allen 72 untersuchten Cysten negativ aus. Die intensive Rotfärbung der umliegenden Epithelkerne bewies, daß dieser Befund spezifisch und nicht auf fehlerhafte Technik zurückzuführen war. Wie aber aus der Arbeit von SCHAEFFER (1945) hervorgeht, darf diese Beobachtung nicht als unbedingt negatives Indiz gewertet werden, da die Kerne der Malaria Parasiten nicht in allen Stadien Feulgen-positiv sind, und auch ein negativer Befund die Anwesenheit sehr kleiner Mengen von Thymonukleinsäure nicht ausschließt.

Obschon sich zahlreiche Forscher mit dem Malaria Parasiten befaßt hatten, sind die Angaben über die fundamentalen cytologischen Vorgänge sehr spärlich. Insbesondere blieb die Frage nach der Reduktionsteilung unbeantwortet. Wohl sind in den letzten Jahren Fortschritte in dieser Richtung erzielt worden. So untersuchte McDougall (1947) bei *Pl. falciparum* und *Pl. vivax* die Reifungsvorgänge im Mikrogametocyten, ohne allerdings abklären zu können, ob bei der Beschickung der männlichen Gameten mit Kernmaterial während der Exflagellation 2 oder 4 Chromosomen beteiligt sind. Wolcott (1955) dagegen stellte in den Kernen von lebenden Blutschizonten der 4 menschlichen Plasmodienarten je-

weils zwei ungleich große Chromosomen fest und schloß daraus, sie seien nicht homolog und der Satz demnach haploid. Seine weiteren Beobachtungen an Gametocyten von *Pl. vivax* und *Pl. falciparum* schienen ebenfalls auf haploide Verhältnisse hinzuweisen. In einer neueren Arbeit (1957) werden auch bei fünf tierischen Plasmodien (*Pl. knowlesi*, *Pl. floridense*, *Pl. berghei*, *Pl. lophurae* und *Pl. relictum*) jeweils zwei Chromosomen beschrieben.

Verschiedene Anzeichen deuten darauf hin, daß die Reduktionsteilung bei den Plasmodien postzygotisch erfolgt, und es ist nahelegend, diese in der ersten Phase der Cystenentwicklung zu suchen. Unsere in Abb. 26 dargestellten Befunde lassen nun die Deutung zu, daß die Reduktion des Kernmaterials in der ersten Teilung der jungen Cyste erfolgt. Während sich der eine daraus resultierende Kern normal weiterentwickelt, verschwindet der zweite nach einiger Zeit, ohne weitere Teilungen durchgemacht zu haben.

Damit wäre also die diploide Phase des Plasmodiums von sehr kurzer Dauer. Sie würde erreicht bei der Befruchtung des Makro- durch den Mikrogameten im Mückendarm und lediglich während der Ookinetenphase, d. h. bis zur Konstituierung der jungen Cyste im Darm andauern. Schon bei der ersten Teilung in der Cyste würde die Hälfte des Kernmaterials beiseitegestellt und kurz vor dem 32-Kern-Stadium eliminiert. Damit wäre bereits wieder der haploide Zustand hergestellt, der für die Sporozoiten sowie für sämtliche extraerythrocytären und erythrocytären Stadien im Warmblüter Geltung hätte bis wieder zu den Gametocyten im Mückendarm. Die Ansicht von WOLCOTT, wonach Schizonten und vielleicht auch Gametocyten haploid wären, würde damit bestätigt. Unklar bleibt allerdings die Zahl der Chromosomen, über die wir bei unsern Untersuchungen keine Anhaltspunkte finden konnten.

VII. Literatur.

- ADLER, S. & THEODOR, O. (1926). The mouth parts, alimentary tract and salivary apparatus of the females in *Phlebotomus papatasi*. — Ann. Trop. Med. Parasit. 20, 109-143.
- AUBERTOT, M. (1934). Recherches sur les péritrophiques des Insectes et en particulier des Diptères. — Thèse Strasbourg.
- BISHOP, A. & McCONNACHIE, E. W. (1956). A study of the factors affecting the emergence of the gametocytes of *Plasmodium gallinaceum* from erythrocytes and the exflagellation of the male gametocytes. — Parasitology 46, 192-215.
- BRUMPT, E. (1936). Etude expérimentale du *Plasmodium gallinaceum* parasite de la poule domestique. Transmission de ce germe par *Stegomyia fasciata* et *Stegomyia albopicta*. — Ann. Parasit. 14, 597-620.

- DAY, M. F. & WATERHOUSE, D. F. (1953). Structure of the alimentary system. Function of the alimentary system. The mechanism of digestion. — In ROEDER, K. D. *Insect physiology*, J. Wiley, New York. 273-330.
- DOLMATOVA, A. V. (1942). Der Lebenscyclus von *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). Russisch. — *Med. Parasit.* 11, 52-70.
- EYLES, D. E. (1951). Studies on *Plasmodium gallinaceum*. II. Characteristics of the infection in the mosquito, *Aedes aegypti*. — *Am. J. Hyg.* 54, 191-212.
- FENG, L. C. (1951). The role of the peritrophic membrane in *Leishmania* and *Trypanosome* infections of sandflies. — *Peking Nat. Hist. Bull.* 19, 327-334.
- FREYVOGEL, T. (1956). Zur Frage der Wirkung des Höhenklimas auf den Verlauf akuter Malaria. — *Diss. Basel, Acta Tropica* 13, 1-57.
- GANDER, R. (1951). Experimentelle und ökologische Untersuchungen über das Schlüpfvermögen der Larven von *Aedes aegypti* L. — *Diss. Basel, Rev. suisse Zool.* 58, 215-278.
- GEIGY, R. & HERBIG, A. (1955). Erreger und Überträger tropischer Krankheiten. — Verlag für Recht und Gesellschaft, Basel.
- GRASSI, B. (1901). Die Malaria. Studien eines Zoologen. — Fischer, Jena.
- HOARE, C. A. (1931). The peritrophic membrane of *Glossina* and its bearing upon the life-cycle of *Trypanosoma grayi*. — *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 25, 57-64.
- HUBER, W. (1950). Recherche sur la structure submicroscopique de la membrane péritrophique de l'intestin moyen chez quelques insectes. — *Arch. Anat. Hist. Embr.* 33, 1-20.
- HUBER, W. (1954). Die submikroskopische Struktur der peritrophischen Membran aus dem Mitteldarm von *Geotrupes silvaticus* (Col.). — *Mitt. Schw. Ent. Ges.* 27, 277-279.
- HUBER, W. & HAASSER, C. (1950). Electron-microscope study of the peritrophic membrane in *Dixippus morosus*. — *Nature* 165, 394.
- HUFF, C. G. (1927). Studies on the infectivity of *Plasmodia* of birds for mosquitoes, with special reference to the problem of immunity in the mosquito. — *Am. J. Hyg.* 7, 706-734.
- HUFF, C. G. (1934). Comparative studies on susceptible and insusceptible *Culex pipiens* in relation to infection with *Plasmodium cathemerium* and *P. relicitum*. — *Am. J. Hyg.* 19, 123-147.
- HUFF, C. G. (1941). Factors influencing infection of *Anopheles* with malarial parasites. — In: *A Symposium on Human Malaria*, Washington. 108-112.
- HUFF, C. G. & MARCHBANK, D. F. (1954). Changes in infectiousness of malarial gametocytes. I. Patterns of oocyst production in seven host-parasite combinations. — *Nav. Med. Res. Inst., Research Report*, 481-494.
- HURLBUT, H. S. (1951). The propagation of Japanese Encephalitis Virus in the mosquito by parenteral introduction and serial passage. — *Am. J. Trop. Med.* 31, 448-451.
- IMMS, A. D. (1951). *A general textbook of Entomology*. — Methuen: London.
- JAGUJINSKAIA, L. W. (1940). Présence d'une membrane péritrophique dans l'estomac de la femelle adulte d'*Anopheles maculipennis*. — *Med. Parasit.* 9, 601-603.
- JAMES, S. P. (1931). Some general results of a study of induced malaria in England. — *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 24, 477-525.
- LEWIS, D. J. (1950). A peritrophic membrane in *Simulium*. — *Nature* 165, 978.
- LEWIS, D. J. (1953). *Simulium damnosum* and its relation to Onchocerciasis in the Anglo-Egyptian Sudan. — *Bull. Ent. Res.* 43, 597-644.
- LUMSDEN, W. H. R. & BERTRAM, D. S. (1940). Observations on the biology of *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935, in the domestic fowl, with special

- reference to the production of gametocytes and their development in *Aedes aegypti* L. — *Ann. Trop. Med. Parasit.* 34, 135-160.
- McDOUGALL, M. S. (1947). The cytological studies of *Plasmodium*: The male gamete. — *J. Nat. Mal. Soc.* 6, 91-98.
- MCLEAN, D. M. (1953). Transmission of Murray Valley Encephalitis Virus by mosquitoes. — *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 31, 481-490.
- MCLEAN, D. M. (1955). Multiplication of viruses in mosquitoes following feeding and injection into the body cavity. — *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 33, 53-66.
- MARTIGNONI, M. E. (1952). Die submikroskopische Textur der peritrophischen Membran von *Peridroma margaritosa* (Haw.). — *Mitt. Schw. Ent. Ges.* 25, 107-110.
- MEGAHED, M. M. (1956). Anatomy and histology of the alimentary tract of the female of the biting midge *Culicoides nubeculosus* Meigen. — *Parasitology* 46, 22-47.
- MERCER, E. M. & DAY, M. F. (1952). The fine structure of the peritrophic membranes of certain insects. — *Biol. Bull.* 103, 384-394.
- NEUMANN, R. O. (1908). Die Übertragung von *Plasmodium praecox* auf Kanarienvögel. — *Arch. f. Protistenkunde* 13, 23-69.
- PAL, R. (1943). On the histological structure of the midgut of mosquitoes. — *J. Mal. Inst. India* 5, 247-250.
- REICHENOW, E. (1932). Die Entwicklung von *Proteosoma circumflexum* in *Theobaldia annulata*, nebst Beobachtungen des Verhaltens anderer Vogelplasmodien in Mücken. — *Jenaische Zschr. f. Natw.* 67, 434-451.
- RICHARDS, A. G. (1951). The integument of arthropods. — Univ. of Minnesota Press, Minneapolis, 411 ff.
- RICHARDS, A. G. & KORDA, F. H. (1948). Studies on arthropod cuticle. II. Electron microscope studies of extracted cuticle. — *Biol. Bull.* 94, 212-235.
- SCHAEFFER, K. (1945). *Plasmodium vivax* und die Feulgen'sche Nuclealreaktion. — *Acta Tropica* 2, 17-22.
- SCHAUDINN, F. (1902). Studien über krankheitserregende Protozoen. II. *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti), der Erreger des Tertianfiebers beim Menschen. — *Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt* 19, 169-250.
- SCHAUDINN, F. (1904). Generations- und Wirtswechsel bei *Trypanosoma* und *Spirochaete*. — *Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt* 20, 387-439.
- SHAH, K., ROZEBOOM, L. & DEL ROSARIO, F. (1934). Studies on the infectivity of *Plasmodium cathemerium* of canaries for mosquitoes. — *Am. J. Hyg.* 20, 502-507.
- SHUTE, P. G. (1935). Agglutination of the red blood-corpuscles of man, animals and birds by the salivary glands of *Anopheles maculipennis*. — *J. Trop. Med. & Hyg.* 38, 277-278.
- SHUTE, P. G. (1938). The position of human malaria oocysts on the stomach of *Anopheles maculipennis*. — *Arch. Roum. Path. Exp. & Microbiol.* 11, 351-354.
- WATERHOUSE, D. F. (1953). The occurrence and significance of the peritrophic membrane, with special reference to adult Lepidoptera and Diptera. — *Austr. J. Zool.* 1, 299-318.
- WATERHOUSE, D. F. (1954). The rate of production of the peritrophic membrane in some insects. — *Austr. J. biol. Sci.* 7, 59-72.
- WEBER, H. (1949). *Grundriß der Insektenkunde*. — Fischer, Jena.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1930). The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. — *Quart. J. Micr. Sci.* 73, 593-616.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1953). *The principles of insect physiology*. — 5. ed. Methuen, London.
- WILDBOLZ, T. (1954). *Beitrag zur Anatomie, Histologie und Physiologie des*

- Darmkanals der Larve von *Melolontha melolontha* L. — Diss. ETH. Mitt. Schw. Ent. Ges. 27, 193-240.
- WOLCOTT, G. B. (1955). Chromosomes of the four species of human malaria, studied by Phase Microscopy. — J. Heredity. 46, 53-57.
- WOLCOTT, G. B. (1957). Chromosome studies in the genus *Plasmodium*. — J. Protozool. 4, 48-71.

VIII. Zusammenfassung.

In dieser Arbeit wurde der Infektionsverlauf von *Plasmodium gallinaceum* im Darm von *Aedes aegypti* untersucht, unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der bisher ungenügend untersuchten peritrophischen Membran (PM).

Die vorliegende Studie gliedert sich in folgende Abschnitte: Im ersten Teil (Kap. II) verschafften wir uns Klarheit über die Bildungsweise und Beschaffenheit der PM. Es zeigte sich, daß sie sich regelmäßig im Anschluß an eine Blutmahlzeit immer von neuem bildet und später mit den unverdaulichen Nahrungsrückständen ausgestoßen wird. Daher besitzen die frisch geschlüpften, die hungrigen und die mit Nektar gefütterten weiblichen sowie die ausschließlich nektarsaugenden männlichen Mücken keine solche. Die vom gesamten Darmepithel als visköses Sekret abgegebene chitinöse und proteinhaltige Substanz verfestigt sich im Zusammenhang mit der einsetzenden Verdauung und umhüllt die aufgenommene Blutmasse vollkommen. Die Festigkeit der Membran erreicht einen bestimmten Höhepunkt und fällt dann gegen Ende des Verdauungsprozesses wieder ab.

Starke Abweichungen in Entstehung und Endstruktur der PM von *Aedes* von den beiden bisher bekannten Bautypen bewogen uns zur Unterscheidung eines neuen Typus III. Dazu gehören außer *Aedes aegypti*, soweit aus der Literatur ersichtlich, eine größere Zahl von Nematoceren, vielleicht auch noch von andern Insektengruppen. Im Zusammenhang mit der Frage nach dem Durchtritt des Malariaookineten durch die PM sind elektronenoptische Untersuchungen durchgeführt worden, wobei, erstmals bei den Dipteren, eine sog. «Streuungstextur» gefunden wurde.

Im zweiten Teil (Kap. III) gingen wir der Frage der ungleichen Cystenverteilung, wie sie bei Anophelen beobachtet wird, nach und konnten nachweisen, daß das Verhalten des Blutes im Magen und die Wirkung der Schwerkraft tatsächlich die dafür verantwortlichen Faktoren sind und die PM dabei keine direkte Rolle spielt. Diese Erkenntnis wurde gewonnen beim Vergleich mit *Aedes*, bei denen im Verlauf der Verdauung kein der Schwerkraft unterliegendes Coagulat, sondern ein gallertiger, das Darmlumen ganz ausfüllender Blutkuchen gebildet wird, wodurch eine gleichmäßige Verteilung der Cysten gewährleistet ist.

Als drittes (Kap. IV) wurde der Perforations- und Penetrationsvorgang der Ookineten untersucht und festgestellt, daß ihr Durchtritt durch die PM an jeder beliebigen Stelle erfolgen kann, die Membran aber mit zunehmender Verfestigung wachsenden Widerstand bietet und nach 30 Stunden keine Passage mehr zuläßt. Die Ookineten treten zwischen den Epithelzellen durch die Darmwand hindurch. Im Zusammenhang betrachtet (Kap. V) zeigte es sich, daß der PM im Verlaufe der Malariainfektion der *Aedes* große Bedeutung zukommt, indem sie die Zahl der zur Weiterentwicklung gelangenden Ookineten beschränkt. Inwiefern diese Beeinflussung der Infektionsstärke auch in andern Plasmodien — Mücken-Kombinationen eine Rolle spielt, müßte von Fall zu Fall abgeklärt werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch vermuten, daß die hier dargestellte Rolle der PM ein neues Licht werfen könnte auf das bisher ungeklärte Problem der unterschiedlichen Plasmodienrezeptivität von Culicidenarten.

Beim Verfolgen der Oocystenbildung wurde auch der heute noch umstrittenen Frage der Reduktionsteilung bei Plasmodien Beachtung geschenkt (Kap. VI). Es liegen Indizienbeweise dafür vor, daß dieselbe postzygotisch bei der ersten Kernteilung in der jungen Oocyste erfolgt. Damit würde WOLCOTT's Befund bestätigt, wonach für die Blutformen die haploide Phase zutrifft. Diese würde sich somit erstrecken von der Reduktionsteilung in der Oocyste über den ganzen Blutzyklus im Warmblüter bis wieder zur Befruchtung des Makro- durch den Mikrogameten im Mückendarm, wo die diploide Chromosomenzahl wiederhergestellt würde.

Curriculum vitae.

Am 24. April 1929 wurde ich, Harro Rudolf Stohler, als Sohn des Rudolf Stohler und der Louise geb. Ungricht, in Basel, wo mein Vater den Beruf eines Wäschezuschneiders ausübt, als Bürger von Ziefen (BL) geboren. Nach 5jähriger Primarschulzeit in Binningen, dem Wohnort meiner Eltern, kam ich 1941 an das Realgymnasium in Basel, das ich 1949 mit dem Maturitätszeugnis verließ. Im Frühling 1949 immatrikulierte ich mich an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel mit der Absicht, in Zoologie zu promovieren.

In der Zoologischen Anstalt, im Zoologischen Garten und im Tropeninstitut besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der Dozenten Geigy, Portmann, Handschin, Hediger, Mislin, Lüscher, Nüesch und Lang — im Botanischen Institut diejenigen von Prof. Geiger-Huber — im Chemischen und Physikalischen Institut die Vorlesungen und Kurse der Dozenten Erlenmeyer, Reichstein, Huber und Kuhn — in der Hygienischen Anstalt diejenigen von Prof. Tomcsik und ferner eine Vorlesung über Paläontologie bei Prof. Reichel. Ich möchte an dieser Stelle allen Dozenten meinen Dank aussprechen.

Die Nebenfachexamina bestand ich in Chemie, Botanik und Bakteriologie-Hygiene.

Meine Dissertation ist auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. R. Geigy am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel entstanden.